

UNSERE ERFAHRUNGEN BEI DER PREGNANDIOL-BESTIMMUNG

MIT DER DÜNNSCSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

von

SILKE BIEBL

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Universitäts-Frauenklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. Friedberg

UNSERE ERFAHRUNGEN BEI DER PREGNANDIOL-BESTIMMUNG
MIT DER DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

SILKE BIEBL

aus Magdeburg

MAINZ 1966

Dekan: Professor Dr. Borneff
Referent: Professor Dr. Stark
Korreferent: Professor Dr. Friedberg
Tag der mündlichen Prüfung: 20.1.1967



INHALT

	Seite
Teil I: Pregnan diol - und seine Stellung im Progesteron-Stoffwechsel	1
Teil II: Rückblick auf die bisherigen Verfahren zur Be- stimmung von Pregnan diol im Urin	7
Teil III: Methodik der Dünnschichtchromatographie zur Pregnan diolbestimmung	21
Teil IV: Ergebnisse	27
Teil V: Diskussion der Methodik	36
Teil VI: Bedeutung der Pregnan diolbestimmung in der Klinik für diagnostische, prognostische und therapeutische Zwecke	42

TEIL I

PREGNANDIOL - UND SEINE STELLUNG IM PROGESTERON-STOFFWECHSEL

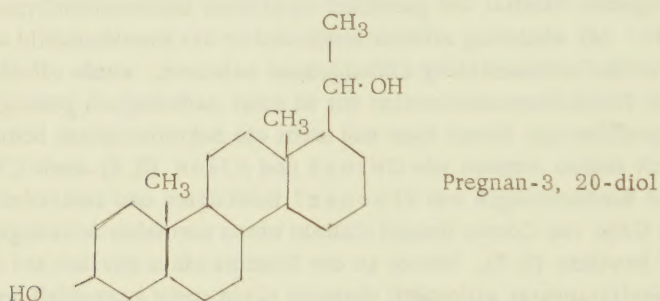
Progesteron ist nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung als ein Hormon bekannt, das im Corpus luteum, in der Placenta und der Nebenniere gebildet wird und dessen Wirken und Hauptfunktion die Vorbereitung und Erhaltung der Schwangerschaft ist.

Bereits seit 1903 war durch Untersuchungen von Fraenkel (1, 2) bekannt, daß beim Kaninchen eine Zerstörung der Corpora lutea die Implantation befruchteter Eier verhindert bzw. eine schon bestehende Gravidität unterbricht. Und 1921 wurde von Schröder und Goerbig (3) nachgewiesen, daß die Proliferations- und Sekretionsphase der Uterusschleimhaut zwei verschiedene Dinge sind, die man zunächst durch rein quantitative Unterschiede des schon länger bekannten Follikelhormons zu erklären versuchte. Als aber das anatomisch-histologische Substrat der glandulär-cystischen Endometriumhyperplasie von Schröder (4) eindeutig erkannt wurde und er das Krankheitsbild als mit vermehrter Follikelhormonbildung einhergehend aufklärte, wurde offenbar, daß verstärkte Follikelhormonsekretion nur zu einer pathologisch gesteigerten Schleimhautproliferation führen kann und nicht die Sekretionsphase bedingt. Nachdem auch andere Autoren wie Corner und Allen (5, 6) sowie Clauberg (7) die Beobachtungen von Fraenkel bestätigten und zusätzlich zeigten, daß die Gabe von Corpus luteum-Extrakt einen normalen Schwangerschaftsablauf bewirkte (5, 6), konnte an der Existenz eines zweiten auf den weiblichen Genitalapparat wirkenden Hormons nicht mehr gezweifelt werden. Es wurde als Corpus luteum-Hormon oder Progesteron bezeichnet. Die wesentlichen Bildungsstätten des Progesteron sind die Corpora lutea und während der Schwangerschaft auch die Placenta. Seine Hauptwirkung besteht in der Ausbildung der Sekretionsphase an der Uterusschleimhaut und bei eingetretener Befruchtung in der Umbildung der Uterusschleimhaut zur Decidua und im Schutz und der Erhaltung der Schwangerschaft, für deren normale Entwicklung es als *conditio sine qua non* erforderlich ist.

Die Isolierung des ersten physikalisch, chemisch und physiologisch charakterisierten einheitlichen Kristallisates mit der Wirkung von Corpus luteum-Extrakt gelang 1934 Butenandt und Mitarbeitern (8) und nahezu gleichzeitig eine nähere Definierung dieses Stoffes auch Slotta und Mitarbeitern (9). Das Kristallinat erwies sich als ein Diketon, und analytische Untersuchungen ergaben

die wahrscheinliche Formel $C_{21}H_{30}O_2$ (10). Butenandt, Westphal und Cobler (11) stellten aus Stigmasterin durch Ersatz von 8 C-Atomen der Seitenkette durch eine Oxygruppe ein ungesättigtes Oxyketon $C_{21}H_{32}O_2$ her, dessen Oxydation ein Stoffgemisch von ungesättigten Diketonen ergab, das eine dem natürlichen Hormon nur wenig nachstehende Corpus luteum Wirkung aufwies. Damit war die Strukturformel des Progesterons weitgehend gesichert. Das ungesättigte Oxyketon und das gesättigte Diketon Pregnandion zeigten keine biologische Wirkung, woraus sich die Bedeutung der Diketonnatur und des ungesättigten Charakters für die physiologische Progesteronwirkung ableiten ließ.

Nahezu parallel zu diesen Erkenntnissen wurde im Urin, der seit der Beobachtung von Aschheim und Zondek, daß im Urin von Schwangeren größere Mengen an Ovarial- und Hypophysenvorderlappen-Hormon enthalten sind (12), zur Untersuchung dieser Stoffe zunehmende Beachtung fand, eine Substanz gefunden, die Butenandt (13) mit dem Namen Pregnandiol bezeichnete, und welche ebenso wie Progesteron eine Beziehung zur Schwangerschaft erkennen ließ.



Sie wurde 1929 von Marrian (14) erstmals aus dem verseifbaren Anteil eines Ätherextraktes aus Urin in Form von weißen Kristalltäfeln gewonnen, die einen Schmelzpunkt bei $233-235^{\circ}C$ hatten (Schmelzpunkt des reinen Pregnandiols $236-237^{\circ}C$). Es handelte sich um eine gesättigte Substanz, deren analytische Untersuchungen eine stickstoff-, schwefel- und halogenfreie C_{19} oder C_{20} Verbindung mit 2 Sauerstoffatomen im Molekül vermuten ließ. Sie war in Wasser und Alkali unlöslich, von auffallend geringer Löslichkeit auch in den üblichen organischen Lösungsmitteln, von denen heißes Aceton noch das beste Lösungsmittel darstellte. Die für Sterine charakteristischen Farbreaktionen wie die Salkowski-Reaktion fielen negativ aus, während die Liebermann-Burchardt-Reaktion mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure in Chloroformlösung eine

rotbraune Färbung von hoher Empfindlichkeit ergab. Die schlechte Löslichkeit in Äther und die relativ bessere in Äthyl- und Methylalkohol legten zusammen mit Untersuchungen über die Bildung eines Diacetates das Vorliegen der beiden Sauerstoffatome als Hydroxylgruppen und damit die Alkoholnatur der Substanz nahe. Die Testung auf biologische Aktivität bezüglich einer Östruserzeugung fiel negativ aus. Butenandt (13) konnte diese Ergebnisse anhand eigener Untersuchungen bis auf die Analysenwerte bestätigen, auf Grund derer er die richtige Summenformel $C_{21}H_{36}O_2$ aufstellte. Da der zugrundeliegende gesättigte Kohlenwasserstoff Pregnan, $C_{21}H_{36}$, 8 H-Atome weniger als ein Grenzkohlenwasserstoff hatte, vermutete er einen aromatischen Kern oder hydrierte Ringe, was er dann durch Nachweis der Stellung der einen Ketogruppe des aus Pregnandiol dargestellten Diketons Pregnandion an einem hydrierten Ring und der anderen in einer $-CO \cdot CH_3$ Gruppe zugunsten der hydrierten Ringe entscheiden konnte. Ihre Zahl schätzte er auf vier. Weitere Untersuchungen (15) sicherten diese Ergebnisse.

Die nahe chemische Verwandtschaft zwischen Pregnandiol und Progesteron und das Auffinden von Substanzen wie Allo-Pregnanolon-(20) im Corpus luteum-Extrakt (16) machten es immer wahrscheinlicher, daß Pregnandiol ein biologisch inaktives Hydrierungsprodukt des Progesterons war. Venning und Browne (17) isolierten dann 1936 einen wasserlöslichen Komplex des Pregnandiols, das Natrium-Pregnandiol-Glucuronat (NaPG) aus Schwangerenurin und wiesen nach, daß das ungesättigte Diketon Progesteron im Organismus in den gesättigten Alkohol Pregnandiol reduziert wird und in an Glucuronsäure gebundener Form im Urin ausgeschieden wird. Die Inaktivierung des Progesterons, das nach Zufuhr von außen sehr schnell aus dem Blut verschwindet (18), und die Koppelung des Pregnandiols an Glucuronsäure finden in der Leber statt, wie Untersuchungen des Blutprogesteronspiegels nach Injektion von Progesteron bei lebergesunden und lebergeschädigten Frauen durch Marti, Schindler und Bühner (19) sowie Patrini (20) zeigten.

Zunächst konnte Pregnandiol nur bei bestehender Schwangerschaft und in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus isoliert werden. Aus einer Beobachtung, daß bei hysterektomierten Frauen nach Progesterongabe kein Pregnandiol ausgeschieden wurde, schloß Venning (21), daß der Uterus möglicherweise für die Umwandlung von Progesteron in Pregnandiol notwendig sei. Diese Vermutung wurde jedoch eindeutig widerlegt erstmals 1939 durch Buxton und Westphal (22), die auch bei Männern mit einem Morbus Addison nach therapeutischer Progesteronverabreichung Pregnandiol im Urin isolieren konnten; 1941 gelang dies Engel, Thorn und Lewis (23) auch bei normalen mit Progesteron behandelten Männern; und in der folgenden Zeit bestätigte

diese Ergebnisse Westphal durch weitere Untersuchungen an normalen Männern (24) sowie normalen männlichen und hysterektomierten weiblichen Kaninchen (25). Ebenso wurde auch bei Frauen in der ersten Phase des menstruellen Zyklus und in der Menopause von verschiedenen Arbeitskreisen Pregnan-diol im Urin aufgefunden. Als Herkunftsort dieser nur sehr geringen Pregnan-diolmenge bei Männern und bei Frauen außerhalb der Schwangerschaft und eines aktiven Corpus luteum nimmt man die Nebenniere an. Denn Progesteron ist nicht die einzige Muttersubstanz des Pregnan-diols. Westphal (26) be-richtete 1942 über die Ausscheidung von Kaninchen zugeführtem Desoxy-corti-costeron als NaPG im Urin; die Umwandlung in Pregnan-diol geht dabei über die Bildung von Progesteron, wie Zarrow, Hisaw und Bryans (27) zeigen konnten. Entsprechend dem heutigen Forschungsstand ist Progesteron nicht ein ausgesprochen spezifisches Hormon des Corpus luteum und der Placenta, son-der nimmt auch als Zwischenprodukt in der Biosynthese der Nebennierenrin-den-Hormone einen wichtigen Platz ein. Beall und Reichstein isolierten bereits 1938 aus der Nebenniere Progesteron (28). Bei Versuchen mit Tieren konnte durch Verabreichung des synthetischen Gestagens 6- α -Methyl-17- α -Hydroxyprogesteronacetat die Produktion von NNR-Hormonen zum Sistieren gebracht werden, was auf die zentrale Stellung des Hydroxyprogesterons in der Corticoidsynthese hinweist (29), und Adezati und Polleri erzielten bei Patienten mit NNR-Hormon-Störungen im Sinne einer vermehrten Synthese der 17-Hydroxysteroiden durch Behandlung mit diesem synthetischen Gestagen merk-liche Besserung (29).

Den Stoffwechsel des Progesterons stellt man sich heute wie folgt vor (32, 33, 31, 30): Die Ausgangsstruktur scheint Acetat zu sein, das - nach Ober und Kaiser (32) möglicherweise als zum Squalen zusammengesetzte Isoprenein-heiten - in Cholesterin umgewandelt wird. Durch Abbau der Seitenkette ent-steht dann Δ^5 -Pregnenolon und weiterhin Progesteron. Versuche von Bloch (34) mittels mit Deuterium gezeichneten Cholesterin, das einer schwangeren Frau verabreicht wurde, ergaben, daß das im Urin ausgeschiedene Pregnan-diol zu etwa der Hälfte bis zwei Drittel aus diesem Cholesterin entstanden war, was somit die Bildung auch von Progesteron aus Cholesterin mit größter Wahrrschein-lichkeit anzeigte. Das Progesteron wird nun einmal zu biologisch inaktiven Sub-stanzen abgebaut, und zum anderen vollzieht sich ein Umwandlungsprozess zu weiteren für den Körper sehr wichtigen biologisch aktiven Stoffen, nämlich den C_{21} -Corticoiden sowie den C_{19} -Androgenen und den Oestrogenen. Die Schlüsselstellung in dem zweiten Weg nimmt das aus Progesteron entstehende 17 α -Hydroxyprogesteron ein, aus dem einerseits die C_{21} -Corticoide gebil-det werden und andererseits Δ^4 -Androsten-3, 17-dion und weiter Testosteron;

aus der letzten Reihe, wahrscheinlich aus dem Δ^4 -Androsten-3,17-dion, gehen ferner die Oestrogene Oestron und Oestradiol hervor. Der Stoffwechselweg vom Pregnenolon zu den Oestrogenen wird zum Beispiel durch die Untersuchungen von Ryan (33) gestützt, der nach Inkubation von Corpora lutea graviditatis mit markiertem Pregnenolon-7- H^3 und Progesteron-4- C^{14} je 1% dieser Substanzen in Oestradiol umgewandelt wiederfand.

Bei der Umwandlung des Progesterons in biologisch inaktive Verbindungen entstehen zunächst die durch die Stellung des Wasserstoffatoms in C_5 zueinander Stereoisomeren Pregnandion und Allopregnandion und aus diesen durch Reduktion dann neben anderen vor allem Pregnan-3 α -ol-20-on, Pregnan-3 α , 20 α -diol und Allopregn-3 α , 20 α -diol. Der überwiegende Teil des Pregnandiols wird in Stellung 3 an Glucuronsäure in β -Konfiguration gebunden (35) und als Mononatriumsalz im Urin ausgeschieden (17). Davis, Plotz, Lupu und Ejarque (31) fanden bei Untersuchungen mit in Position 4 markiertem C^{14} -Progesteron ca. 60% der Aktivität in einer Zeit von 6-9 Tagen im Urin und Stuhl wieder; im Fettgewebe waren zwischen 6 und 40% der Aktivität nachweisbar; in der Atemluft ließ sich nur dann eine Aktivität messen, wenn in Position 21 markiertes Progesteron verwendet wurde, was dafür sprach, daß wohl die Seitenkette aufgespalten wird, nicht aber das Ringsystem.

Experimentelle Hinweise dafür, daß Progesteron in der Leber inaktiviert wird, lieferten Untersuchungen verschiedener Arbeitskreise (23, 18), die die Wirkung von in den Leberkreislauf injiziertem Progesteron nach Passage der Leber erheblich vermindert oder ganz aufgehoben fanden, während nach subcutaner Progesteron-Applikation eine charakteristische Endometriumumwandlung erfolgte (18). Ferner isolierten Pearlman und Cerceo (36) aus der Gallenblase trächtiger Kühe Pregnan-3 α -ol-20-on und Pregnan-3 α , 20 β -diol; und Sandberg und Slaunwhite (37) stellten nach C^{14} -Progesteron-Injektion eine höhere Gesamtaktivität bei Menschen mit einer Gallenfistel fest. Letztere Beobachtung legte nahe, daß Progesteron und seine Abbauprodukte mit der Galle in den Darm ausgeschieden werden, zu einem nicht geringen Teil wieder resorbiert und vermutlich im Fettgewebe abgelagert werden (32). Weitere Ergebnisse im Sinne einer Progesteroninaktivierung in der Leber lieferten die bereits erwähnten Arbeiten von Marti und Mitarbeitern (19) und Patrini (20) an lebergesunden und lebergeschädigten Frauen.

Es ist zu beachten, daß in Abwesenheit eines aktiven Corpus luteum und einer Placenta injiziertes Progesteron nur zu einem Anteil von ca. 10-15% (32) im Urin ausgeschieden wird, und die einzelnen Um- und Abbauewege des Pro-

gestérons bei weitem noch nicht genau bekannt sind. Jedoch kann zweifelsohne gesagt werden, daß Pregnandiol von den bisher isolierten Substanzen das Hauptausscheidungsprodukt des Progesterons ist.

Ebenso kann festgehalten werden, daß das aus dem Progesteronabbau in der Nebenniere stammende Pregnandiol im Verhältnis zu der aus der Progesteronsekretion in den Ovarien bzw. der Placenta sich ableitenden Pregnandiolmenge so gering ist, daß die Pregnandiolausscheidung im Urin durchaus als ein Index der endogenen Progesteronbildung in Corpus luteum und der Placenta betrachtet werden kann.

TEIL II

RÜCKBLICK AUF DIE BISHERIGEN VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON PREGNANDIOL IM URIN

Hormonbestimmungen können prinzipiell im Blut und im Urin gemacht werden. Diese beiden Möglichkeiten geben aber keine äquivalenten Werte. Denn eine Bestimmung im Blut zeigt eine momentane Konzentration an, während die Untersuchung in einer Probe des 24 Std. Urins die gesamte Ausscheidung des Organismus pro Tag berücksichtigt und damit eine aufschlußreichere Aussage zuläßt. Aus diesem Grunde wurden auch die Pregnandiolbestimmungen vorwiegend im Urin vorgenommen, zumal dieses Material leichter zugänglich ist.

Weiterhin lassen sich die Hormonbestimmungen in biologische und chemische Methoden einteilen. Progesteron kann mit Hilfe biologischer Tests untersucht werden. Pregnandiol jedoch erwies sich bei allen Versuchen als biologisch inaktive Substanz (13, 14), die somit nur auf chemischem Wege erforscht werden konnte.

Nachdem Pregnandiol erstmalig 1929 von Marrian (14) bei der Präparierung von "Oestrin" aus dem Urin gravidierender Frauen gefunden worden war und 1930 und 1931 von Butenandt (13, 15) aus demgleichen Material isoliert, identifiziert und in einem Formelausdruck definiert wurde, erlangte diese Substanz auf Grund ihrer aus dem chemischen Aufbau vermuteten Verwandtschaft zum Progesteron zunehmendes Interesse.

Eine erste Methodik wurde von Venning 1937 (38) entwickelt, nachdem es Venning und Browne (17) gelungen war, einen wasserlöslichen Komplex des Pregnandiols aus Gravidenurin zu isolieren, der sich auf Grund analytischer Untersuchungen als ein Natriumsalz der Pregnandiol-Glucuronsäure erwies. Es handelte sich um eine weiße kristalline Substanz, die in Wasser löslich war, in Äther dagegen unlöslich, in Äthylalkohol bis zu einem gewissen Grade löslich war und einen Schmelzpunkt bei 268-271 ° C zeigte. Dieses Natrium-Pregnandiol-Glucuronat (NaPG) wurde wie folgt bestimmt: Urin in der Menge von ca. 1 Liter des 24 Std. Volumens wurde mit Butanol extrahiert, der Extrakt zur Trockne verdampft, der Rest mit Wasser und Aceton in Wärme gelöst und nachtsüber im Kühlschrank stengelassen. Es fiel ein weißes Präzipitat aus, das nach Abzentrifugieren in Wasser und heißem Äthanol gelöst, filtriert, verdampft und dann gravimetrisch gemessen wurde. Zur Beurteilung

der Reinheit des Ergebnisses nahm man eine Schmelzpunktbestimmung vor. Da es zu 10-30% Verunreinigungen enthielt, war für eine quantitative Aussage eine zweite Präzipitation aus Aceton und Wasser nötig. Manche Begleitsubstanzen im Urin, wie zum Beispiel Blut, erschwerten die Reinigung des NaPG sehr und machten oft eine mühevollen Wiederholung der einzelnen Prozesse erforderlich, ohne immer zum Ziel zu führen. Die Wiedergewinnung einer dem Urin zugegebenen bekannten Menge NaPG betrug nach Angaben des Autors bei Werten zwischen 20-40 mg ziemlich konstant 85%, und die Methode galt für diesen und höhere Quantitätsbereiche als annähernd genau, während sie bei kleineren Mengen unzuverlässig war und ab etwa 5 mg nur noch qualitative Aussagen zuließ. Das ermittelte NaPG konnte durch Multiplikation mit dem Faktor 0,597, der sich aus dem Molekulargewichtsverhältnis Pregnandiol : NaPG ergab, in Pregnandiol umgerechnet werden. Prüfungen auf Vorkommen des Pregnandiols im Urin normaler Männer und normaler nichtgravider Frauen hatten bisher übereinstimmend zu negativen Ergebnissen geführt (14, 15).

Venning (38, 39) konnte mit seiner Methode jedoch erstmalig auch im Urin nichtgravider Frauen während der Lutealphase des menstruellen Zyklus NaPG nachweisen. Die quantitativen Angaben durften allerdings nur unter Vorbehalt betrachtet werden. Denn um die noch messbare Menge von 5 mg NaPG zu erhalten, mußte der gesamte 24 Std. Urin, oft sogar mehrere Tagesurine vereinigt, extrahiert werden, wodurch sich der prozentuale Anteil der Verunreinigungen erhöhte. Als Verbesserungen empfahl Venning (39) die Anwendung von Trikresol oder Toluol bei der Sammlung des Urins und seine Aufbewahrung im Kühlschrank, um einer bakteriellen Zersetzung des NaPG vorzubeugen. Weiterhin sollten bei der Extraktion entstehende Emulsionen zentrifugiert und nochmals mit Butanol extrahiert werden, der Gesamtextrakt zusätzlich mit NaOH gereinigt und bei der zweiten Präzipitation die Lösung erwärmt werden, damit beim Erkalten weitere Verunreinigungen ausfielen. Trotz dieser Verbesserungen ließen sich bei den niedrigen Konzentrationen der nichtgraviden Frau 5 mg NaPG/l Urin nur zu 70-75% wiedergewinnen. Bei kleineren Werten waren die Ergebnisse völlig unzuverlässig.

Allen und Viergiver (40) entwickelten 1941 ein anderes Verfahren, das in seinem ersten Teil - Extraktion mit Butanol und Entmischung zwischen wässriger NaOH und Butanol - der Methode von Venning entsprach. Dann aber fällten sie das Pregnandiolglucuronid als sein Bleisalz aus, lösten es wieder in alkoholischer Natriumcarbonat-Lösung und hydrolysierten es mit Salzsäure. Die Menge der dabei freigesetzten Glucuronsäure wurde ermittelt durch Messen ihrer Reduktionskraft mittels des Shaffer-Hartmann-Somogyi Reagens (alkalisches Kupfer-Reagens) vor und nach der Hydrolyse. Aus einer anhand

der Bearbeitung bekannter Mengen NaPG aufgestellten Tabelle konnte man die entsprechende NaPG-Konzentration ablesen. Allen und Viergiver hielten die Präzipitation des Pregnandiolglucuronids mit Bleinitrat für quantitativer als die aus wässriger Lösung mit Aceton, insbesondere bei kleinen Konzentrationen wie 5 mg/l Urin. Ihre unkorrigierten Werte über Untersuchungen während der Schwangerschaft zeigten eine Ausscheidungskurve, die im wesentlichen der von Venning aufgestellten, bereits korrigierten Kurve entsprach. Die Rückgewinnung des dem Urin zugesetzten NaPG variierte durchschnittlich zwischen 87 und 95%. Die Autoren beabsichtigten mit diesem Verfahren eine Möglichkeit für die Bestimmung der Pregnandiolausscheidung zu geben, die die Isolation einer möglichst reinen Verbindung - wie sie für die gravimetrische Bestimmung notwendig war - nicht erforderte. Eine bedeutende Fehlerquelle lag jedoch in dem Umstand, daß auch Androgene (41) und Oestrogene (41 A) in zum großen Teil an Glucuronsäure gebundener Form im Urin ausgeschieden werden, wobei insbesondere die Androgene laut Allen und Viergiver (40) zu einer Fehlerquote von 2-10% des gefundenen NaPG Anlaß geben können. Ihr Verfahren war wohl empfindlicher als das von Venning, aber nicht sehr spezifisch.

Klinische Fragestellungen nach dem genauen Beginn der Corpus luteum-Aktivität während des menstruellen Zyklus veranlaßten Westphal 1941 (24) die Methode von Venning in dem Sinne zu modifizieren, daß die Bestimmung der Pregnandiolausscheidung pro Tag möglich wurde. Es handelte sich in der Hauptsache um eine Anpassung der Einzelprozesse an eine kleinere Urinmenge. Die Ergebnisse waren in der ersten Zyklushälfte negativ und lagen in der Lutealphase zwischen 0,2-8,0 mg NaPG/24 Std. Doch häuften sich immer mehr übermäßig hohe und unregelmäßige Werte, die den Vorstellungen von der zyklischen Progesteronsekretion durchaus nicht mehr entsprachen. Aus diesem Grunde überprüfte Westphal die Endprodukte der Harnaufbereitungen durch Ausfällen des Pregnandiolglucuronids als das besonders schwer lösliche Bariumsalz. Die offenbar fälschlich hohen und fälschlich in der ersten Zyklushälfte gefundenen Werte wurden dabei auf das übliche Maß bzw. negative Werte reduziert. Es konnte bewiesen werden, daß unter anderem Natriumcarbonat das Endprodukt verunreinigt hatte. Mit der Methode der Barium-Pregnandiolglucuronid-Fällung ließen sich so geringe Mengen wie 0,25 mg NaPG noch nachweisen. Sogar aus dem Urin normaler unbehandelter Männer gelang es Westphal, Pregnandiolglucuronid als Bariumsalz auszufällen, was bisher noch nicht gelungen war. Er vermutete, daß es aus der NNR stammte, eventuell durch Umwandlung aus Desoxycorticosteron (25,26). Die Quantitäten

dieser Pregnandiolausscheidung bei Männern bewegten sich jedoch in einem so niedrigen Bereich, daß sie die klinische Bedeutung der Pregnandiolbestimmung - nämlich ein Spiegelbild der Progesteronsekretion aus Corpus luteum und Placenta zu zeichnen - nicht störten.

Die Untersuchungen von Westphal hatten deutlich gezeigt, daß die Identifizierung der Harnaufbereitungsprodukte als NaPG durch Schmelzpunktbestimmungen alleine nicht zuverlässig war. In demselben Sinne sind spätere Ergebnisse von Sutherland und Marrian 1947 (42) zu werten, die mittels der Methode von Venning präpariertes NaPG in die Natriumglucuronate einer nonketonic fraction und ketonic fraction trennten; letztere bestand aus Natrium-Pregnanolonglucuronat. Das "NaPG" enthielt nach Marrian und Gough (43) nur ca. 80% reines NaPG.

Wegen der Schwierigkeiten bei der Identifikation und genauen Messung des NaPG, insbesondere bei Zyklusuntersuchungen, ferner wegen der Gefahr des Pregnandiolverlustes durch Freisetzung aus seiner gebundenen Form bereits während der Urinsammlung, versuchten Astwood und Jones (45) das freie Pregnandiol aus dem Urin zu isolieren und zu bestimmen. Sie beschrieben 1941 eine Methode, die im wesentlichen aus folgenden Schritten bestand: Trennung des freien Pregnandiols von der Glucuronsäure durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure in Gegenwart von Toluol; Extraktion des Urins mit Toluol; Entfernung der im Extrakt verbliebenen HCl-Spuren durch Waschen mit Aqua dest. und dann des Wassers durch Erhitzen; Reinigung des Toluolextraktes mit methanolischer NaOH-Lösung; ein- bis mehrmalige Präzipitation des Pregnandiols aus wässrigem Alkohol; Trocknen des Kristallisates im Ofen bei 90° C. und gravimetrische Messung.

Diese Methode war relativ einfach, erforderte keine Spezialapparaturen und keine besondere Vorsicht während der Urinsammlung. Beimengungen von Blut oder Eiweiß im Urin hatten keinen störenden Einfluß; sie war in dieser Hinsicht also für klinische Routineuntersuchungen geeignet. 3 mg Pregnandiol konnten aus 1 Liter Urin zu durchschnittlich 68% zurückgewonnen werden, mit einer mittleren Schwankungsbreite von 5,15%. Kleinere Mengen gestatteten keine feste Aussage. Versuche zeigten, daß bei der Hydrolyse mit HCl maximal nur 80% des NaPG aufgespalten wurden. Bei der Prüfung des Verhaltens anderer neutraler Steroide bei der Präzipitation aus wässrigem Alkohol fanden Astwood und Jones, daß nach zweimaliger Präzipitation Mengen von 16 mg Cholesterol bzw. 8 mg Androsteron pro Liter Urin notwendig sind, um aus der alkoholischen Lösung auszufallen. Diese Quantitäten finden sich jedoch im normalen Urin nicht (45).

Basierend auf dieser Methode entwickelten Talbot und Mitarbeiter (46) ein Verfahren, das eine prozentuale Rückgewinnung des nach der Hydrolyse zugesetzten reinen Pregnan-diols von ca. 90% der theoretischen Werte ermöglichte. Sie hydrolysierten den Urin in Anwesenheit von Tetrachlorkohlenstoff - statt Toluol -, isolierten die nonketonic fraction von der ketonic fraction mittels Girard's Reagens, extrahierten erstere mit Toluol und reinigten den Extrakt mit alkoholischer Alkali-Lösung ähnlich wie Astwood und Jones. Zur Messung des Pregnan-diols führten sie jedoch eine colorimetrische Technik ein, die in der Folgezeit von vielen anderen Arbeitskreisen benutzt wurde. Nach Zugabe von konz. Schwefelsäure zu alkoholischer Lösung von Pregnan-diols entwickelte sich eine gelbe Farbe, die bei der Wellenlänge $420\text{ m}\mu$ colorimetrisch gemessen wurde. Diese Farbreaktion war zwar sehr empfindlich, doch unspezifisch. Andere Steroide und Pigmente reagierten mit konz. Schwefelsäure in fast gleicher Art. Um dadurch die Meßergebnisse nicht fälschlich zu erhöhen, galt eine sorgfältige Reindarstellung des Endproduktes als Voraussetzung, was mit einem entsprechend großen Zeitaufwand verbunden war.

Guterman (47,48,49) gab 1944 eine bedeutend einfachere Methode an, die im Prinzip auf die beiden vorhergenannten aufbaute und Pregnan-diols ebenfalls colorimetrisch bestimmte. Für die Durchführung benötigte er nur 3 Stunden. Die verbleibenden Verunreinigungen waren aber relativ hoch und beeinträchtigten die Genauigkeit. Er empfahl die Anwendung seiner Methode als Schwangerschaftstest (47).

Geringe Pregnan-diolkonzentrationen, wie sie in der frühen Gravidität und außerhalb der Schwangerschaft anzutreffen sind, zu bestimmen, war immer noch mit einer Fragwürdigkeit belastet. Nach Sommerville und Mitarbeitern (50) war eine zuverlässige Ermittlung von weniger als $10\text{ mg}/24\text{ Std.}$ nicht möglich. Für die klinischen Problemstellungen waren jedoch gerade die kleinen Quantitätsbereiche wichtig. Deshalb modifizierten Sommerville, Gough und Marrian (50) 1948 die von Astwood und Jones sowie von Talbot und Mitarbeitern angegebenen Verfahren mit spezieller Ausrichtung auf geringe Pregnan-diolsmengen. Die wesentlichen Veränderungen bestanden in folgendem: Reinigung des Toluolextraktes mit wässriger NaOH statt mit methanolischer NaOH, was bei einfacherer Handhabung für ebenso wirksam gehalten wurde; Erhöhung der Zahl der Präzipitationen aus Äthanol auf 3, um neben anderen Steroiden besonders Dehydroisoandrosteron weitgehend zu eliminieren; Sammlung der einzelnen Präzipitate jeweils durch Zentrifugieren als quantitativere Methode; langsame Abkühlung während der Auskristallisation aus Äthanol durch Einstellen in einen Inkubator bei 37°C für jeweils wenigstens 2 Stunden; Erwärmen des so gereinigten Pregnan-diols in äthanol-

scher Lösung unter Zugabe von Holzkohle zur Entfernung störender Pigmente; Durchführen der Farbreaktion mit Schwefelsäure im Wasserbad von 25° C zwecks Standardisierung.

Für wichtig hielten die Autoren anhand entsprechender Versuche vor allem die langsame Abkühlung während der Auskristallisation, deren Nichtbeachtung sie zum Teil die Verluste bei den Methoden von Talbot und Mitarbeitern und von Guterman zuschrieben. Ferner zeigten sie, daß Androsteron, Isoandrosteron und Pregnan-3(α)-ol-20-on zwar nicht völlig eliminiert werden konnten, ihr Einfluß auf die Farbreaktion in den im Urin üblich vorhandenen Mengen aber ohne Bedeutung war. Pregnan-3(α), 17,20-triol, eine unter starker Farbbildung mit Schwefelsäure reagierende Substanz, wurde bei der Hydrolyse größtenteils zerstört, der Rest durch die Präzipitationen beseitigt. Dehydroisoandrosteron, ebenfalls stark reagierend, ließ sich nicht gänzlich entfernen, durch 3 Präzipitationen jedoch bedeutend mehr verringern als durch eine. Die Methode war mühsam, aber die Empfindlichkeit konnte auf ziemlich genaue Ergebnisse bis zu etwa 2 mg/24 Std. erhöht werden. Eine Anwendung ihrer Methode bei pathologischen Urinen von Patienten, bei denen eine hohe Ausscheidung von 17-Ketosteroiden und anderen Steroiden der Nebenniere zu erwarten war, empfahlen die Autoren nicht (50).

Als bedeutende Neuerung führte Huber (51) 1947 die chromatographische Technik zur Isolierung von Pregnandiol ein. Die Säurehydrolyse, Extraktion mit Toluol und Reinigung des Extraktes von sauren und phenolischen Verbindungen durch Behandlung mit methanolischer NaOH und Filtrieren wurde mit nur geringen Abänderungen von der nach Guterman angegebenen Methode übernommen. Zur quantitativeren Isolierung des Pregnandiols wurde dann aber eine chromatographische Adsorption an Aluminiumoxydsäulen durchgeführt mit anschließender Elution mit einer Benzol-Äther Mischung. Behandlung mit absolutem Äther und Rekristallisation aus Methanol ergaben weitgehend reines Pregnandiol mit einem Schmelzpunkt bei 234-236° C, das gravimetrisch gemessen wurde. Die Methode war bei einer Rückgewinnungsquote von 90-95% des dem Urin zugegebenen reinen Pregnandiols ziemlich genau und bis zu Mengen von 5 mg/l Urin empfindlich. Die Durchführungszeit belief sich auf 3-5 Stunden, so daß 4-6 Untersuchungen pro Tag von einer Laborantin gemacht werden konnten (51).

De Watteville, Borth und Gsell (52) wandten diese Methode in etwas modifizierter Form bei großen Untersuchungsserien an. Die Verdampfung des Toluolextraktes auf einer Heizplatte bis zur Trockne hielten sie für zu grob und engten den Toluolextrakt deshalb nur auf ein kleineres Volumen ein, um ihn

dann als solchen der Chromatographie auf der Aluminiumsäule zu unterziehen. Die Elution führten sie mit einer Mischung von Benzol und Äthylalkohol (20:1) aus. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Huber konnten sie reines, kristallines Pregnandiol nach Zugabe zum Urin zu 95-100% zurückgewinnen; reines pregnanolonfreies NaPG ergab jedoch nur 65-70% der theoretischen Werte. Diese Einbuße entsprach dem bekannten, bei der Hydrolyse konjugierter Steroide vorkommenden Verlust (52). Der Grenzwert der Methode lag bei etwa 0,5 mg/l Urin (53).

Eine ebenfalls chromatographische Methode, bei der Pregnandiol colorimetrisch gemessen wurde, entwickelte Stimmel 1952 (54). Er hatte sie so gestaltet, daß in derselben Urinprobe gleichzeitig Oestrogene bestimmt werden konnten. Zu diesem Zweck benutzte er eine Äthyläther-Toluol-Mischung zur Extraktion und verdampfte dann den Äther. Nach Entmischung mit NaOH wurde der Alkalianteil zur Oestrogenbestimmung gebraucht und der Toluolanteil zur Pregnandiolbestimmung. Bei letzterer wurde wieder auf Aluminiumoxydsäulen chromatographiert. Stimmel eluierte zuerst mit Benzol, wodurch die Monohydroxysteroiden (Androsteron, Cholesterol, Dehydroisoandrosteron, Pregnanolon) ausgewaschen wurden, die folgende Fraktion von 2%igem Methanol-Benzol eluierte die Dihydroxysteroiden (Diole) und damit das Pregnandiol. Die verbliebenen Trihydroxysteroiden (Triole) konnte man mit 10%igem Methanol-Benzol herauslösen. Nach Präzipitation aus wässrigem Äthanol bestimmte er das Pregnandiol colorimetrisch mit konz. Schwefelsäure, wobei er den Wellenlängenbereich von 400-450 m μ abstastete. Bei der näheren Untersuchung der Absorptionsspektren verschiedener mit Schwefelsäure unter gelber Farbentwicklung reagierender Neutral-Steroide ergab sich folgendes: Pregnanol-3(α)-on-20 zeigte über eine Wellenlänge von 380 m μ hinaus keine Absorption; in dem für Pregnandiol typischen Bereich zwischen 400-450 m μ absorbierten zusätzlich die Substanzen Dehydroisoandrosteron, die C-19-triole ((Δ^5 -Androsten-3(β), 16(β), 17(α)-triol und Androstan-3(β), 16(α), 17(α)-triol)) und die C-19-diole ((Δ^5 -Androsten-3(β), 17(α)-diol, Δ^5 -Androsten-3(β), 17(β)-diol, Androstan-3(β), 17(β)-diol, Androstan-3(α), 17(β)-diol)). Da Dehydroisoandrosteron und die C-19-triole durch die Chromatographie bereits abgetrennt wurden, blieben nur die C-19-diole als mögliche interferierende Substanzen. Jedoch einzig Pregnandiol wies bei 420 m μ stets eine stärkere Absorption auf als bei 410 m μ , so daß Stimmel das Absorptionsverhältnis 420 m μ : 410 m μ = größer als 1 als Characteristicum für Pregnandiol aufstellte. Allerdings mußte er die Gültigkeit beschränken, da mit den überprüften 16 Neutral-Steroiden noch nicht alle im Urin möglicherweise vorkommenden Steroide erfaßt waren. Die Schwefelsäurereaktion war auf diese Weise

spezifischer gestaltet worden. Die Methode erlaubte 1-10 mg Pregnandiol / 24 Std. befriedigend zu bestimmen. Der Verlust bei Zugabe von NaGP belief sich auf 20-30%, kristallines Pregnandiol wurde quantitativ zurückgewonnen.

Ein aus den prinzipiellen Stufen der Säurehydrolyse, Extraktion, Reinigung, Säulen-Chromatographie und colorimetrischer Messung mit konz. Schwefelsäure bestehendes Verfahren gaben 1952 Chaney, Mc Kee, Fischer und Mc Colgan (55) an. Bei gleich guten Ergebnissen wie bei anderen freien Pregnandiol bestimmenden Methoden, war es ihr Bestreben, die Ausführung einfach zu gestalten, um sie dem klinischen Gebrauch zugänglich zu machen. Die aufzuarbeitende Urinprobe reduzierten sie auf 50 ml. Zur Extraktion benutzten sie das aliphatische Lösungsmittel Isooctan, das sie für selektiver hielten; der Extrakt und die Reinigungslösungen mußten aber stets eine Temperatur von 50-60° C haben, damit eine gute Löslichkeit des Pregnandiols garantiert war. Der Behandlung mit methanolischer NaOH wurde ein Verlust an Pregnandiol zugeschrieben und statt dessen hochprozentige wässrige NaOH (10%ig und 50%ig) gebraucht. Bei der Chromatographie wurde Pregnandiol an eine Mischung von Calciumcarbonat und Celit adsorbiert und mit Toluol-Methanol eluiert. Nach Messung der Pregnandiolkonzentration im Photometer bei 425 m μ galten als befriedigende Reinheit des Endproduktes folgende Verhältnisse der optischen Dichte:

$$\frac{\text{Dichte bei } 425 \text{ m}\mu}{\text{Dichte bei } 390 \text{ m}\mu} = \text{ca. } 1,5$$

$$\frac{\text{Dichte bei } 425 \text{ m}\mu}{\text{Dichte bei } 460 \text{ m}\mu} = \text{ca. } 1,8$$

Der maximale Verlust bei der Bestimmung von zugesetztem reinen Pregnandiol betrug 7%.

Cohen (56) veröffentlichte 1951 eine Technik zur fermentativen Hydrolyse des im Urin enthaltenen NaPG mittels β -Glucuronidase. Das pH-Optimum der β -Glucuronidase-Aktivität liegt bei 4,5, während es für die meisten anderen Steroid-Glucuronide bei 5 liegt. 100-500 ml Urin inkubierte man, nach 10 minutenlangem Kochen und Einstellung auf pH 4,5 mit Acetatpuffer, mit 1000 Einheiten β -Glucuronidase für 6 Stunden bzw. nachtsüber. Aus der Tatsache, daß die Hydrolyse nach 5-6 Stunden beendet war und entsprechend der Urinmenge nur 1000 Einheiten erforderte, offenbarte sich eine etwa 20 mal höhere Labilität des NaPG gegenüber β -Glucuronidase als die der meisten anderen Steroide (57).

Diese neue Art der NaPG-Hydrolyse führten Goldfine und Cohen (57) 1953 erstmals in ein Verfahren der Pregnandiolbestimmung ein. Vergleichende Untersuchungen der Hydrolyserate durch β -Glucuronidase und Salzsäure ergaben keine Differenz; die Anwendung des Fermentes bot jedoch den Vorteil einer nur geringen gleichzeitigen Hydrolyse anderer Steroid-Glucuronide (57). Zur Reinigung des Toluolextraktes benutzten sie eine auf Sommerville (50) zurückgehende, aber vereinfachte Methodik: Nach Auswaschen mit 1 n NaOH und Aqua dest. Verdampfen der Lösung zur Trockne; dann Lösen des Restes in heißem Äthanol unter Zugabe von Holzkohle und Filtrierung; Konzentrieren des Volumens auf 5 ml und Inkubation bei 37° C mit heißer 0,1 n NaOH für 2-4 Stunden; Lösen des Präzipitates in Äthanol. Das Pregnandiol wurde schließlich colorimetrisch gemessen. Das Verfahren war recht empfindlich und erlaubte Mengen bis zu 0,5 mg Pregnandiol/24 Std. mit einiger Genauigkeit zu bestimmen (57). Die Werte lagen allgemein nur halb so hoch wie die bei der Bestimmung von NaPG (39, 58) ermittelten, was auch Smith, O. W. an eigenen Untersuchungen mit Schwangerenurinen feststellte (59). Dies erklärte sich durch die im bereits gereinigten NaPG nachgewiesenen Verunreinigungen (43, 44). Die erforderliche Arbeitszeit war nicht so sehr lang und ermöglichte - abgesehen von der Inkubationszeit - pro Tag die Bearbeitung von 6 Proben. Die Verfasser empfahlen die Anwendung ihrer Methode zur Diagnostik der Schwangerschaft und gynäkologischer Störungen, da sich auch die frühe Follikelphase aufschlußreich untersuchen ließ.

Klopper und Mitarbeiter (60) arbeiteten 1955 eine Methode aus, die eine zweimalige Säulenchromatographie und als neuen Reinigungsschritt eine Oxydation mit 4%iger Kaliumpermanganat-Lösung enthielt. Die Hydrolyse wurde mit Salzsäure vorgenommen und die Extraktion mit Toluol. Von der ersten Aluminiumoxydsäule eluierte man das Pregnandiol mit 3%igem Äthanol in Benzol und löste den eingedampften Rückstand in Benzol und Acetylchlorid. Das nunmehr entstandene Pregnandioldiacetat wurde dann nach Aufnehmen in Petrol-Äther der zweiten Chromatographie auf einer Aluminiumoxydsäule unterzogen. Das Pregnandioldiacetat wurde mittels der Farbreaktion mit Natriumsulfit und konz. Schwefelsäure colorimetrisch gemessen und durch Multiplizieren mit dem Faktor 0,8 (Molekulargewichtsverhältnis) in Pregnandiol umgerechnet. Die erhaltenen Ergebnisse waren recht genau bis zu 0,5 mg/24 Std. Die Rückgewinnungsrate betrug bei diesen Konzentrationen über 90% unter Annahme einer vollständigen Hydrolyse des NaPG.

Eine andere Art der Chromatographie, die Papierchromatographie, wurde für die Pregnandiolbestimmung von Eberlein und Bongiovanni (61, 62) 1958

eingeführt. Sie hielten eine prolongierte Säulenchromatographie, die jedoch für den klinischen Gebrauch ungeeignet ist, wiederholte Säulenchromatographie wie bei Klopfer (60) oder die Papierchromatographie für erforderlich, um das Pregnandiol so weitgehend von interferierenden Steroiden und Pigmenten zu reinigen, daß mit der empfindlichen, aber unspezifischen colorimetrischen Messung den geringen Konzentrationen angemessen genaue Werte erhalten werden konnten. Die Vorteile der Papierchromatographie sahen sie in der Möglichkeit, gleichzeitig eine Vergleichsprobe mit reinem standardisierten Pregnandiol und 4 unbekannte Extrakte unter denselben Bedingungen bearbeiten zu können. Bei der Aufspaltung des NaPG bedienten sie sich wieder der enzymatischen Hydrolyse mit β -Glucuronidase (3500 Einheiten, 12-18 Std. Inkubation). Als Extraktionsmittel wurde Benzol verwandt. Für die ascendierende Chromatographie wurde Filterpapier mit Silicagel überzogen; nach Behandlung mit Aqua dest. und Äthanol 6-12 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet, 4 Stunden bei 150° C erhitzt und war dann längere Zeit im Trockenschrank haltbar. Silicagel sollte die Steroidgemische besser trennen als Aluminiumoxyd (63). Als Lösungsmittelsystem wurde eine Mischung aus Isooctan, Toluol, Methanol und Aqua dest. benutzt. Nach Angleichung der stationären Lösungsphase an Zimmertemperatur nachtsüber (reduzierbar auf 1 Std.) dauerte die Entwicklung des Chromatogramms 6 Stunden. Die Elution wurde 3 mal mit Methanol vorgenommen, wobei die erste 3 Stunden erforderte, die beiden weiteren je 15 Minuten. Wenn ungewaschenes Filterpapier zur Anwendung kam, mußte anschließend noch eine Schnell-Chromatographie auf einer kleinen Silicagel-Säule (10 ml-Spritze) gemacht werden (30-40 Minuten). Die Messung von Pregnandiol geschah colorimetrisch bei 425 m μ (und 390 m μ und 460 m μ), und zwar nach Farbentwicklung mit einer Bisulfit-Schwefelsäure-Mischung. Zur Korrektur wurde die Formel von Allen (64) benutzt:

$$\text{corr. O. D. 425} = \text{O. D. 425} - \frac{(\text{O. D. 390} + \text{O. D. 460})}{2}.$$

Reines zum Urinextrakt zugegebenes Pregnandiol wurde zu 77,8% zurückgewonnen. Obwohl die Methode nicht einfach war, hielten Eberlein und Bongiovanni sie für das klinische Labor durchaus als geeignet. Pro Woche ließen sich 16-24 Proben analysieren.

Jedoch fand die Methode von Klopfer und Mitarbeitern eine breitere Anwendung als jene. Und auch Lipp (65) bezeichnete das Verfahren von Eberlein und Bongiovanni als nicht befriedigend bei Zyklusuntersuchungen im Vergleich zu dem von Klopfer und Mitarbeitern. Die Versuche von Lipp mit

Urinen männlicher Neugeborener überschritten aber auch die Kapazität der Methode von Klopfer. Bei derartig minimalen Pregnandiolkonzentrationen war die Reinigung nicht mehr adäquat. Lipp kombinierte zu diesem Zwecke die Adsorptionschromatographie mit der Papierchromatographie in einer eigenen Methode (65): Im Anfangsteil entsprach sie mit geringen Modifikationen den Angaben von Klopfer und Mitarbeitern. Für Routinebestimmungen wurde statt deren zweiter Adsorptionschromatographie eine absteigende Papierchromatographie ausgeführt (sonst Papierchromatographie erst nach zweiter Säulenchromatographie). Neben der in Aceton gelösten Urinaufarbeitung wurde Pregnandioldiacetat als Testsubstanz aufgetragen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit einer mit Testbenzin gesättigten Mischung von 96%igem Äthanol und Aqua dest. (3:1) und dauerte 14-16 Stunden. Durch Besprühen des getrockneten Teststreifens mit Phosphormolybdänsäure ermittelte man die Lage der Pregnandiol-diacetat-Bande und eluierte dann dreimal (insgesamt 80 Minuten) mit Methanol. Anschließend wurde noch einmal an einer Säule aus Aluminiumoxyd in wassergesättigtem Petroläther rechromatographiert und mit Benzol eluiert. Den trockenen Rückstand des Pregnandioldiacetates inkubierte man schließlich mit Natriumsulfit und konz. Schwefelsäure 17 Stunden bei 27° C und maß die Extinktion gegen einen Sulfit-Schwefelsäure-Leerwert bei 380 m μ , 420 m μ und 460 m μ unter Anwendung einer etwas modifizierten Allen-Gleichung (64) für die korrigierte Extinktion:

$$E_{\text{korr.}} = 2 E_{420} - E_{380} - E_{460} - P_{\text{korr.}}$$

$$(P_{\text{korr.}} = \text{korr. Papierleerwert})$$

1,25 mg Diacetat entsprachen 1 mg Pregnandiol (65). Das Infrarotspektrum des Pregnandioldiacetates galt als höchst spezifischer Identitätsnachweis, der die Reinheit des Produktes bewies, und auch das Spektrum mit Schwefelsäure zeigte die Reinsubstanz an; schon 0,006-0,01 mg Pregnandiol hatten ein deutliches Absorptionsmaximum bei 420 m μ (65). Die Methode erlaubte eine ziemlich genaue Bestimmung kleinster Mengen des Bereiches 0,002-0,2 mg Pregnandiol. Der erste Teil des Verfahrens ergab nach Klopfer und Mitarbeitern bei Urinzusätzen von 0,025 mg Pregnandiol eine Wiedergewinnung von durchschnittlich 92%, die Papier- und folgende Säulenchromatographie nach Auftragen von 0,005-0,04 mg Pregnandioldiacetat im Mittel 101% $\pm$ 4,2. Diese überaus empfindliche und genaue Methode ließ sich nach Angabe der Autoren auch für klinische Routinezwecke gebrauchen. Pro Woche konnten 16 Proben bearbeitet werden, ein Ergebnis erhielt man jedoch frühestens nach 48 Stunden.

Die Glasfaser-Papierchromatographie, eine die Genauigkeit und Empfindlichkeit der Papierchromatographie besitzende, aber bedeutend einfachere und schnellere Art als die Filterpapierchromatographie wurde 1962 von Staub, Gaitan und Dingman (66) für die Pregnandiolbestimmung eingeführt. Nach enzymatischer Hydrolyse mit β -Glucuronidase, Extraktion mit Benzol und Waschen durch 1 n NaOH und Aqua dest. wurde der in Benzol gelöste Rückstand sowie eine Pregnandiol-Vergleichsprobe auf das Glasfaserpapier, das mit Kaliumsilikat getränkt war, mittels einer 150 μ l-Pipette aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogrammes durch ascendierende Technik mit einer Mischung von Cyclohexan und Aceton 100:3 dauerte 1 Stunde. Die Markierung des Standard-Pregnandiol- R_f -Wertes erfolgte durch konz. Schwefelsäure, und der ausgeschnittene Streifen wurde descendierend mit Äthylacetat eluiert. Die optische Dichte der mit Schwefelsäure-Bisulfit gebildeten Farbe ermittelte man wiederum im Spektralphotometer bei 390 $m\mu$, 425 $m\mu$ und 460 $m\mu$ und korrigierte den bei 425 $m\mu$ gemessenen Wert anhand der Korrektionsformel von Allen. Pregnandiolmengen zwischen 0,05-0,1 mg, die dem Urin zugegeben waren, wurden im Mittel zu 98% wiedergewonnen. Untersuchungen mit 7-H^3 -Pregnandiol offenbarten keinen wesentlichen Einfluß begleitender Substanzen auf den R_f -Wert, wohl aber seine bedeutende Veränderung durch hohe Luftfeuchtigkeit. Das jeweilige Mitlaufen einer standardisierten Pregnandiol-Probe war also ratsam.

Wenn auch diese Methode von Staub und Mitarbeitern für jene minimalen Mengen von 0,002 mg Pregnandiol nicht genügend empfindlich war, konnte sie durchaus kleinere Konzentrationen als 1 mg/24 Std., wie sie zum Beispiel in der Follikelphase des Zyklus ausgeschieden werden, zuverlässig bestimmen und war dabei relativ einfach auszuführen. In einer Woche ließen sich 50 Urinproben analysieren (66).

Von Jones, Turner, Sarlos, Barnes und Cohen (67) wurde 1962 noch über eine gaschromatographische Analyse berichtet, wobei ein ungereinigter Toluolextrakt verwendet werden konnte. Auf Polysiloxan-Säulen trennte man zunächst Pregnandiol, Allo-Pregnandiol und Pregnanolon gemeinsam ab, die dann voneinander isoliert wurden. Für Routinezwecke war der Zeitaufwand aber zu groß.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die anfänglichen Methoden, sowohl die sich der Bestimmung von NaPG bedienenden als auch jene für freies Pregnandiol, nur höhere Konzentrationen, wie sie im Urin schwangerer Frauen zu finden waren, mit einiger Genauigkeit bestimmen konnten. Die Reindarstellung des NaPG aus dem Urinextrakt war nicht eindeutig, wie sich zeigte (43,

44). Außerdem war die NaPG-Bestimmung mit der Gefahr der vorherigen bakteriellen Zersetzung im Urin belastet (32). Von großer Bedeutung war der Ersatz der gravimetrischen Messung des Endproduktes durch die colorimetrische Bestimmung im Spektralphotometer nach Entwicklung einer Farbreaktion mit dem zu untersuchenden Pregnandiol und konz. Schwefelsäure durch Talbot und Mitarbeiter (46). Sie war sehr empfindlich, aber unspezifisch. Die Rückgewinnung von zugesetztem reinen Pregnandiol ließ sich auf 90% erhöhen. Einen anderen großen Fortschritt stellte die Einführung der Chromatographie in die Pregnandiolbestimmung dar (Huber 1947). Zunächst wurde sie in Form einer Chromatographie auf Säulen aus Aluminiumoxyd angewandt. Erst die zweimalige Durchführung dieser Säulenchromatographie - Klopfer 1955 - ergab eine der Unspezifität der colorimetrischen Messung adäquate Reinigung der Harnaufbereitungen von anderen interferierenden Steroiden und Pigmenten. Jetzt konnten auch die außerhalb der Schwangerschaft vorkommenden niedrigen Pregnandiolkonzentrationen - also vor allem der Menstruationszyklus - mit befriedigender Genauigkeit bestimmt werden (65). Die früher für die Untersuchung insbesondere der kleinen Pregnandiolmengen notwendige Aufarbeitung großer Urinvolumina, die bis zu der ganzen 24 Std., manchmal sogar 48 Std.-Sammlung reichte, konnte mit zunehmender Empfindlichkeit der Methodik auf immer kleinere Maße reduziert werden. Chaney und Mitarbeiter (55) verwandten 1952 im Mittel nur noch 50 ml Urin. Dies brachte nicht nur eine einfachere Handhabung mit sich, sondern verringerte auch die notwendig abzutrennenden Verunreinigungen. Die Anwendung der fermentativen Hydrolyse mit β -Glucuronidase anstelle der Säurehydrolyse mit HCl - erstmals 1953 von Goldfine und Cohen (57) zur Pregnandiolbestimmung benutzt - brachte keinen wesentlichen Vorteil. Die Gefahr der Substanzzerstörung, die bei heftiger HCl-Hydrolyse gegeben ist, wurde zwar gemildert, doch der Aktivitätsgrad der β -Glucuronidase war ein nicht immer konstanter Faktor. Heute wird in den meisten Fällen wieder mit Salzsäure hydrolysiert.

Die Papierchromatographie, 1958 von Eberlein und Bongiovanni (61) in die Pregnandiolbestimmungs-Methodik eingeführt, stellte ein der doppelten Säulenchromatographie äquivalentes Verfahren dar und bot zusätzlich den Vorteil der gleichzeitigen Bearbeitung einer Testprobe mit bekanntem Pregnandiolgehalt und mehrerer unbekannter Extrakte unter identischen Bedingungen. Der erforderliche Arbeits- und Zeitaufwand war aber relativ groß. Lipp (65) kombinierte 1960 Säulen- und Papierchromatographie zu einem aufwendigen Verfahren, das minimale Pregnandiolkonzentrationen des Bereiches 0,002-0,2mg erlaubte. Es scheint in der Hauptsache für Forschungs-

zwecke von Wert zu sein. Für den klinischen Gebrauch genügen Methoden, deren untere Grenze höher liegt, die dafür aber bedeutend schneller und einfacher in der Durchführung sind, wie es zum Beispiel die 1962 von Staub und Mitarbeitern (66) berichtete Methode der Glasfaser-Papierchromatographie bietet.

TEIL III

METHODIK DER DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE ZUR PREGNANDIOLBESTIMMUNG

Das von uns angewandte Verfahren beruht auf der von Stahl näher beschriebenen und ausgearbeiteten Technik der Dünnschichtchromatographie (68, 69, 70, 71, 72). Wir haben im wesentlichen die dünnschichtchromatographische Methode zur Pregnanliolbestimmung nach Walldi (73, 74, 75) übernommen.

Sie besteht aus den Stufen der Hydrolyse mit konz. Salzsäure, der Extraktion mit Cyclohexan, der Reinigung, der Trennung durch Dünnschichtchromatographie, der Auswertung des Chromatogramms und der Berechnung der Pregnanliolwerte.

1. Extraktion und Hydrolyse:

Der Urin wurde während der Sammlung im Kùhlschrank, wenn er mehrere Tage unverarbeitet blieb, in der Tiefkùhltruhe aufbewahrt. Es kamen nur Mischproben des gesamten 24 Std. Volumens zur Verwendung.

20 ml filtrierter Urin (bei Untersuchungen in der Schwangerschaft 10 ml Urin, die zur Vermeidung der Umstellung des Arbeitsganges auf das kleinere Volumen mit Aqua dest. auf 20 ml aufgefüllt werden) wird in einen 50 ml-Rundkolben gegeben und nach Zugabe von 2 ml konz. Salzsäure (1/10 der Ausgangsmenge) unter dem Abzug durch Erhitzen im Wasserbad hydrolysiert. Die Temperatur des Urins wird durch Einstellen eines Thermometers kontrolliert; sie soll in 2-3 Minuten auf 90° C gebracht und auf dieser Höhe während der 10 Minuten dauernden Hydrolyse gehalten werden. Anschließend wird unmittelbar unter fließendem Leitungswasser auf Zimmertemperatur abgekùhlt. Dann wird die Probe in einen 100 ml-Scheidetrichter übergefùhrt und dreimal mit je 25 ml Cyclohexan extrahiert.

2. Reinigung des Extraktes:

Die vereinigten Cyclohexanextrakte werden in demselben Scheidetrichter zweimal mit je 20 ml einer 1 n wässrigen NaOH-Lösung ausgewaschen (Neutralisierung der sauren und phenolischen Gruppen) und der im Cyclohexanextrakt verbliebene Alkali-Rest durch zweimaliges Ausschütteln mit je 30 ml Aqua dest. entfernt. Der endgùltige neutrale Cyclohexanextrakt muß frei

von jeglichen Wasserspuren sein, da sie die weitere Handhabung störend beeinflussen. Zu diesem Zweck versetzt man ihn mit 5-7 g Natriumsulfat siccum und läßt ihn nach gutem Durchschütteln einige Minuten stehen. Danach wird er in einen 100 ml-Rundkolben filtriert und das Filtrat im Wasserbad von 50°C und im Vacuum einer Wasserstrahlpumpe bis zur Trockne verdampft (ca. 40-50 Minuten). Den Rückstand nimmt man in wenigen ml Chloroform auf; unter Filtrieren durch einen kleinen Wattefilter wird er in ein Spitzröhrchen quantitativ übergeführt (zweimaliges Nachspülen des Rundkolbens). Diese Chloroform-Lösung wird schließlich im leichten Stickstoffstrom und unter Anwendung einer Schüttelapparatur im Wasserbad von 50°C zur Trockne verdampft. Gut verschlossen kann der Extraktückstand im Kühlschrank über längere Zeit aufbewahrt werden.

3. Isolierung des Pregnandiols mit der Dünnschichtchromatographie:

a) Präparierung der Dünnschichtplatten:

Mehrere saubere Glasplatten (20 • 20 cm) werden auf der zur Grundausrüstung gehörenden Arbeitsschablone nebeneinander gelegt und mit einem alkohol- oder acetongetränkten Wattebausch von etwaigen Fettspuren gereinigt. Dann wird die Adsorptionsmasse, die jedesmal unmittelbar vor dem Bestreichen der Platten frisch zuzubereiten ist, aus 20 g Kieselgel G und 40 ml Aqua dest. in einem Mörser angerührt; dies soll nicht länger als 1 1/2 Minuten dauern und die Masse selbst frei von Luftblasen und Klümpchen sein. Mit Hilfe des Dünnschicht-Streichgerätes wird sie auf die Platten aufgetragen. Nach kurzem Betrocknen an der Luft bis das überschüssige Wasser verdunstet und die Masse abgebunden ist, werden die Platten in ein ebenfalls zur Grundausrüstung gehörendes Leichtmetall-Gestell geschoben und 30 Minuten im Trockenschrank bei 110°C aktiviert. Wenn sie bei Zimmertemperatur abgekühlt sind, können sie sofort gebraucht oder auch zur Verwertung erst am nächsten Tag in einer möglichst trockenen Umgebung aufbewahrt werden. Die bestrichenen Platten müssen vorsichtig gehandhabt werden und dürfen nur an den Kanten angefaßt werden. Im durchfallenden Licht kann man die Gleichmäßigkeit der Adsorptionsschicht überprüfen.

Mit einer harten Bleistiftspitze wird die Schicht unter Verwendung der Beschriftungsschablone in mehrere ca. 15-20 mm breite Laufbahnen unterteilt. Am unteren Plattenrand wird durch schnelles Abstreifen mit dem Finger entlang der Kante eine scharfe Linie gezogen. Die Startlinie liegt 15 mm vom unteren Schichtrand entfernt; ihre Höhe wird auf jedem zweiten Laufbahnstrich ganz leicht markiert. Oben zieht man einen schmalen horizontalen Beschriftungsrand.

b) Auftragen der Substanzen:

Der Extraktückstand wird in Chloroform gelöst; entsprechend der zu erwartenden Pregnan diolkonzentration haben wir bei Urinen gravidier Frauen in 0,5 ml Chloroform, bei solchen nichtschwangerer geschlechtsreifer Frauen (Zyklusuntersuchungen) in 0,25 ml und bei jenen von Frauen außerhalb der Geschlechtsreife in 0,15 ml Chloroform gelöst. Als Standard-Vergleichslösung dient eine 0,25%ige Pregnan diollösung in absolutem Alkohol. Zum Auftragen benutzen wir die 'Agla'-Mikrometerspritze. Ihre kleinste Meßeinheit beträgt 1' (sprich: 1 Strich); 1' entspricht einem Volumen von 0,0002 ml (= 0,2 μ l); 1 volle Umdrehung des Mikrometerteiles wiederum umfaßt 50' und entspricht somit dem Volumen von 0,01 ml (= 10 μ l).

Man trägt nun in Höhe der Startlinie in den einzelnen Laufbahnen abwechselnd nebeneinander Vergleichslösung und Extraktlösung auf. Im allgemeinen haben wir folgendes Schema mit 9 Laufbahnen angewandt: Laufbahn 3, 5 und 7 für Extraktlösung, Laufbahn 1, 2, 4, 6, 8 und 9 für Vergleichslösung. Die Vergleichslösung wird in von Laufbahn 1 zu Laufbahn 9 steigenden Mengen aufgetragen. Von dem Extrakt können entweder ebenfalls 3 verschiedene Mengen derselben Probe aufgebracht werden oder gleichzeitig 3 verschiedene Extrakte, nachdem man zuvor diese zweckmäßigerweise mit einem kleinen Teil der Chloroformlösung auf ihren annähernden Pregnan diolgehalt untersucht hat und dadurch eine dem Bereich der aufgetragenen Pregnan diol-Standard-Lösung entsprechende Extraktmenge auf die Platte aufbringen kann. Handelt es sich um Urinextrakte von Frauen außerhalb der Geschlechtsreife, bei denen nur minimale Mengen oder gar kein Pregnan diol zu erwarten ist, haben wir 350' - die größtmögliche Menge - auf nur einen Startpunkt aufgetragen. Während des Applizierens der Substanzlösungen wird ein Föhn benutzt.

c) Entwicklung des Chromatogramms:

Die Entwicklung erfolgt in einer rechteckigen Trennkammer. Ihre Wände werden mit Filterpapier so ausgekleidet, daß es auf den Boden aufstößt, also in die Steigflüssigkeit eintaucht, und oben bis nahe zum Rand reicht. Hierdurch wird eine höhere Kammer sättigung erreicht. Als Elutionsmittel dient eine Mischung aus 80 ml Chloroform und 20 ml Aceton (Spiegelhöhe 5-7 mm). Die Platte stellt man leicht schräg in die Trennkammer; zwei Platten können durch V-förmige Anordnung gleichzeitig in einer Kammer entwickelt werden. Stets muß die Kammer mit einer geschliffenen Glasplatte gut verschlossen werden. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt bei Zimmertemperatur. Es dauert ungefähr 45-50 Minuten, bis die Lösungsmittelfront den Beschriftungsrand erreicht hat und die Platte herausgenommen werden muß.

d) Auswertung des Chromatogramms:

Nachdem die überschüssige Flüssigkeit auf der herausgenommenen Platte verdunstet ist, besprüht man sie unter dem Abzug mit 40%iger o-Phosphorsäure, bis die Adsorptionsschicht durchsichtig feucht ist. Das Pregndiol, das bis nicht ganz der halben Plattenhöhe gelaufen ist, und das etwas darüber sich befindende Allo-Pregndiol werden dabei als weiße, fettartige Flecken sichtbar. Zur Auswertung haben wir sie jedoch noch nicht herangezogen. Anschließend stellt man die Platte für 15-20 Minuten in den Trockenschrank bei 110°C. Beim Betrachten unter der UV-Lampe zeigen die Pregndioflecken nun eine braungraue bis grünliche Fluoreszenz, die sich gut auswerten läßt.

Zur Illustration dieser Fluoreszenz sei ein Photoprint in der Abbildung 1 angeführt.

Nach weiterem Einstellen in den Trockenschrank bis zu der Gesamtzeit von 1 Stunde (ohne zwischenzeitliches Herausnehmen genügen 30-40 Minuten) haben sich die Pregndioflecken hellbraun gefärbt. Diese Färbung ist ebenfalls gut zur Auswertung geeignet. Die noch heiße Platte besprüht man schließlich mit einer frisch zubereiteten Lösung von Phosphormolybdat in Äthanol (ca. 1-2 Spatelspitzen in 30 ml). Dabei geht die Farbe der Flecken in ein Dunkelblauschwarz über, zunächst hauptsächlich nur Pregndiol und Allo-Pregndiol, mit der Zeit in immer stärkerem Maße auch die anderen Substanzen.

Das Ablesen der Werte muß deshalb stets sofort erfolgen. Wir haben in der Regel nur die Braunfärbung nach Besprühen mit Schwefelsäure und Einstellen in den Trockenschrank quantitativ genau gewertet, teilweise auch die Dunkelblauschwarz-Färbung.

Eine andere Möglichkeit der Auswertung ist das Besprühen der Platte unmittelbar nach Entnahme aus der Trennkammer mit Vanillin-Schwefelsäure (3 g Vanillin in 100 ml absolutem Äthanol gelöst und mit 0,5 ml Schwefelsäure (1.84) vorsichtig versetzt) und anschließendes Einstellen in den Trockenschrank bei 110°C bis zur Ausbildung violett gefärbter Flecken. Diese Methode haben wir nicht vorgenommen, da hierbei die anderen Wertungsarten nicht mehr ausführbar sind.

4. Berechnung des Pregndiolgehaltes:

Zum leichteren Verständnis seien einige Maßeinheiten und Zahlenverhältnisse vorausgeschickt:

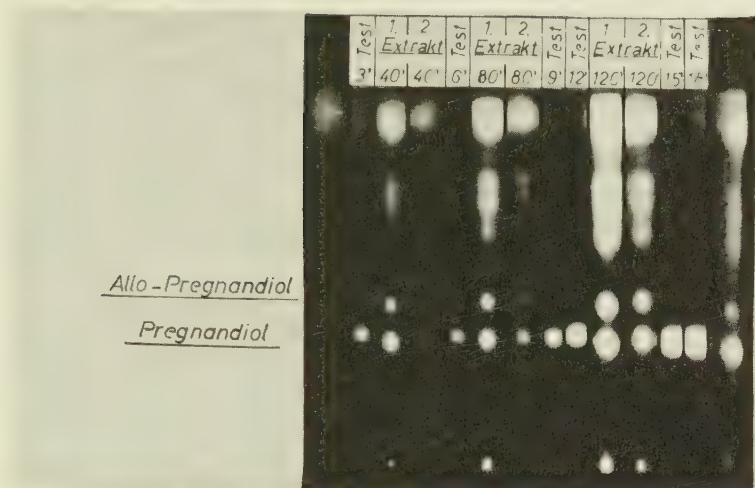


Abb. 1: Photoprint. Fluoreszenzerscheinungen unter der UV-Lampe (Wellenlänge 365 m μ) auf der chromatographierten, mit o-Phosphorsäure besprühten und 15-20 Minuten bei 110°C getrockneten Dünnschichtplatte.

$$1' = 0,0002 \text{ ml} = 0,2 \mu\text{l}$$

$$50' = 0,01 \text{ ml} = 10 \mu\text{l}$$

$$250' = 0,05 \text{ ml} = 50 \mu\text{l}$$

$$1' \text{ der } 0,25\% \text{igen Pregnandiol-Standard-Lösung} = 0,5 \gamma \text{ Pregnandiol} \\ = 0,0005 \text{ mg Pregnandiol.}$$

$$1 \gamma \text{ Pregnandiol} = 0,001 \text{ mg Pregnandiol} = 2' \text{ der } 0,25\% \text{igen Pregnandiol-} \\ \text{Standard-Lösung.}$$

Als Ablesungswert gilt die aufgetragene Pregnandiol-Standard-Menge in ' (Strich), deren Fleck in Größe und Intensität dem Extraktflecken entspricht.

Die Umrechnung des abgelesenen Strich (')-Wertes erfolgt nach jeweils folgender Formel:

1. Bei 20 ml Urin als Ausgangsmaterial und Lösung des Extraktes in 0,25 ml Chloroform (Zyklus):

$$\text{mg Pregn. /24 Std.} = \frac{\text{Ablesungswert in '} \cdot \text{Urinvolumen (24 Std) in ml}}{\text{aufgetragenes Extraktvolumen in '} \cdot 32}$$

2. Bei 10 ml Urin als Ausgangsmaterial und Lösung des Extraktes in 0,5 ml Chloroform (Gravidität):

$$\text{mg Pregn. /24 Std.} = \frac{\text{Ablesungswert in '} \cdot \text{Urinvolumen (24 Std) in ml}}{\text{aufgetragenes Extraktvolumen in '} \cdot 8}$$

3. Bei 20 ml Urin als Ausgangsmaterial und Lösung des Extraktes in 0,15 ml Chloroform (Menopause):

$$\text{mg Pregn. /24 Std.} = \frac{\text{Ablesungswert in '} \cdot \text{Urinvol. (24 Std) in ml} \cdot 3}{\text{aufgetragenes Extraktvolumen in '} \cdot 160}$$

oder, da das aufgetragene Extraktvolumen hier konstant 350' beträgt, kürzer:

$$= \frac{\text{Ablesungswert in '} \cdot \text{Urinvol. (24 Std) in ml} \cdot 3}{56.000}$$

Anschließend sei noch das Zustandekommen zum Beispiel der Formel 1. erläutert:

Als Ablesungswert wird die Unbekannte x und als aufgetragenes Extraktvolumen die Unbekannte y eingesetzt.

Der dem Ablesungswert x' entsprechende Pregnandiol-Standard-Fleck enthält $x \cdot 0,5 \gamma$ Pregnandiol (1' Pregn.-Stand.-Lösg. = $0,5 \gamma$ Pregn.).

Der ihm entsprechende Extraktfleck enthält somit ebenfalls
 $x \cdot 0,5 \gamma$ Pregn.

Es gilt also:

$$y' = x \cdot 0,5 \gamma \text{ Pregn.}$$

$$1' = \frac{x \cdot 0,5}{y} \gamma \text{ Pregn.}$$

$$1250' (= 0,25 \text{ ml}) = \frac{x \cdot 0,5 \cdot 1250}{y} \gamma \text{ Pregn.}$$

Danach sind in der dem Extrakt entsprechenden Ausgangsmenge von

$$20 \text{ ml Urin} = \frac{x \cdot 0,5 \cdot 1250}{y} \gamma \text{ Pregn.}$$

$$= \frac{x \cdot 0,5 \cdot 1250}{y \cdot 1000} \text{ mg Pregn.}$$

$$\text{in 1 ml Urin} = \frac{x \cdot 0,5 \cdot 1250}{y \cdot 1000 \cdot 20} \text{ mg Pregn.}$$

$$\text{u. im 24 Std. -Urin} = \frac{x \cdot 0,5 \cdot 1250 \cdot \text{Urinvol. (24 Std) in ml}}{y \cdot 1000 \cdot 20} \text{ mg Pregn.}$$

$$= \frac{x \cdot \text{Urinvolumen (24 Std) in ml}}{y \cdot 32} \text{ mg Pregnandiol.}$$

Die beiden anderen Formeln 2. und 3. werden entsprechend abgeleitet.

TEIL IV

ERGEBNISSE

Es darf vorangeschickt werden, daß wir mit unseren Untersuchungen nicht die Absicht verfolgten, die Pregnandiolausscheidung unter der Sicht einer bestimmten Fragestellung zu erforschen, sondern die Eignung der Dünnschichtchromatographie zur Pregnandiolbestimmung im klinischen Labor zu testen. In diesem Sinne wurden für die Versuche Urine verschiedener Ausgangssituationen gewählt, vorwiegend solche normal menstruierender Frauen.

Unser Material besteht aus:

1. 5 Menstruationszyklen normaler, unbehandelter Frauen, bei denen in 2-tägigem Abstand die Pregnandiolausscheidung pro 24 Stunden bestimmt und die Basaltemperatur gemessen wurde;
2. mehreren Pregnandiolbestimmungen bei verschiedenen normalen graviden Frauen mit fortgeschrittener Gravidität;
3. einigen Pregnandiolbestimmungen bei Frauen in der Menopause und nach Ovariectomie.

Wie die nachfolgenden Kurven und Tabellen zeigen, liegen die von uns mit der Methode der Dünnschichtchromatographie gefundenen Werte in dem bekannten und auch von den anderen Arbeitskreisen (77, 60, 61, 76, 66, 74, 78) in den letzten Jahren berichteten Bereich ((Klopfer: Follikelphase ca. 1 mg/Tag, Lutealphase "juvenile" Zyklen 2-3 mg/Tag, Lutealphase "adulte" Zyklen 4-6 mg/Tag (77); Menopause im Mittel 0,63 mg/Tag, normale Männer im Mittel 0,92 mg/Tag (60); Eberlein und Bongiovanni: Follikelphase ca. 0,7-1,5 mg/Tag, Lutealphase bis ca. 4 mg/Tag (61); Keller und Hauser: Follikelphase bis zu 2 mg/Tag, Lutealphase Anstieg bis auf 13 mg/Tag möglich, Menopause und gesunde Männer bis etwa 2 mg/Tag (76); Staub und Mitarbeiter: Follikelphase etwa 0,2-1,5 mg/Tag, Lutealphase etwa 2-6 mg/Tag, Gravidität im IX. Monat zwischen 11 und 19 mg/Tag (66); Waldi: Lutealphase bis 3-5 mg/1 Urin (74))).

Die individuelle Ausscheidung variiert deutlich: In den Menstruationszyklen 1 und 2 lag die Tagesausscheidung in der Follikelphase merklich unter 1 mg (bis ca. 0,3 mg in Zyklus 1, bis ca. 0,5 mg in Zyklus 2) und stieg in der Lutealphase auf 2,3 mg (Zyklus 1) bzw. 1,9 mg (Zyklus 2) an. Bei Zyklus 3 schwankte sie in der ersten Zyklushälfte um 1 mg und erhöhte sich in der

zweiten Zyklushälfte bis auf 2,8 mg. Im 4. Zyklus betrug die Ausscheidung in der Follikelphase mit einer Schwankung zwischen 1 und 3 mg noch mehr und stieg dann bis auf 7 mg am Zyklusende an. Zyklus 5 zeigte eine langanhaltende Ausscheidung zwischen 0,3 und 1,4 mg, die erst am 27. Tag zu steigen begann, um am 36. Tag das Maximum von 7,5 mg zu erreichen; es handelte sich hierbei um einen 37-tägigen Zyklus. Die Menstruationszyklen 1, 3 und 4 ließen am Ende der Lutealphase ein Absinken der Pregnandiolausscheidung erkennen, bei den beiden anderen Zyklen ist dieser Abfall infolge der nicht täglich durchgeführten Bestimmungen vermutlich nicht erfaßt worden.

Auch die Pregnandiolwerte, die in den letzten 3 Monaten der Gravidität ermittelt wurden, zeigten deutliche individuelle Schwankungen mit einem Variationskoeffizienten von 39%. Bei 11 Bestimmungen an 11 Frauen betrug die höchste Ausscheidung um 22 mg und die niedrigste 5,2 mg; im Mittel war sie jedoch merklich höher als in der Lutealphase des menstruellen Zyklus.

Unsere in der Menopause und nach Ovariectomie gefundenen Werte lagen bei ebenfalls großen Variationen (Variationskoeffizient Menopause 72%, Variationskoeffizient Ovariectomie 88%) in einem relativ niedrigen Bereich; sie überschritten 0,25 mg/Tag nicht. Dies stützt die Annahme, daß das aus dem Progesteronabbau der Nebenniere stammende Pregnandiol doch sehr gering ist, und der Abbau dieses NN-Progesterons zu Pregnandiol nur einen kleinen Nebenweg des Steroidstoffwechsels der Nebenniere darstellt. Der Hauptanteil des Progesterons mit seiner spezifischen biologischen Aktivität wird also im Ovar und der Placenta gebildet.

Tabelle I: Pregnandiolbestimmung im Urin:
- Menstruationszyklus 1 -

Zyklustag:	mg Pregn. /24 Std.
2. Tag	0,20 mg
4.	0,25
6.	0,23
8.	0,19
10.	0,26
11.	0,17
13.	0,27
14.	0,34
15.	0,27
16.	0,70
17.	1,00

Pregnandiolbestimmung während des menstruellen Zyklus
(Dünnschichtchromatographie, mg/Tag)

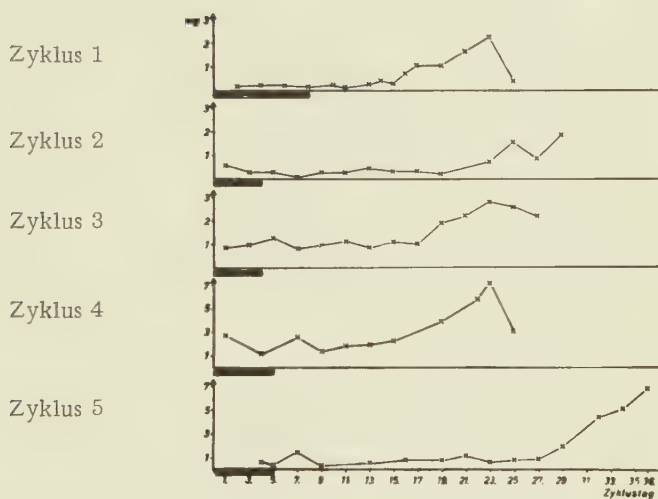


Abb. 2: Pregnanediolbestimmung während des menstruellen Zyklus in mg/Tag.

Zyklustag:	mg Pregn. /24 Std.:
19. Tag	1,00 mg
21.	1,62
23.	2,26
25.	0,31

Tabelle II: Pregnadiolbestimmung im Urin:
- Menstruationszyklus 2 -

Zyklustag:	mg Pregn. /24 Std.:
1. Tag	0,60 mg
3.	0,30
5.	0,31
7.	0,06
9.	0,32
11.	0,33
13.	0,40
15.	0,34
17.	0,32
19.	0,25
23.	0,68
25.	1,55
27.	0,81
29.	1,90

Tabelle III: Pregnandiolbestimmung im Urin:
- Menstruationszyklus 3 -

Zyklustag:	ml Urin/24 Std.:	mg Pregn. / 24 Std.:	mg Pregn. / 1 Urin:	Basaltemp. 6 Uhr:
1. Tag	950 ml	0,85 mg	0,89 mg	36,8° C
3.	645	0,97	1,50	36,3
5.	1040	1,26	1,21	36,35
7.	535	0,79	1,51	36,5
9.	1010	- - -	- - -	36,45
11.	795	1,14	1,43	36,5
13.	750	0,91	1,21	36,6
15.	1200	1,01	0,84	36,5

Fortsetzung Tabelle III:

Zyklustag:	ml Urin/24 Std:	mg Pregn. / 24 Std.:	mg Pregn. / 1 Urin:	Basaltemp. 6 Uhr:
17. Tag	660 ml	0,99 mg	1,50 mg	36,6° C
19.	1480	1,91	1,29	36,9
21.	1170	2,18	1,86	36,9
23.	1070	2,78	2,60	36,9
25.	1050	2,55	2,43	37,1
27.	1160	2,24	1,93	37,0

Tabelle IV: Pregnandiolbestimmung im Urin:

- Menstruationszyklus 4 -

Zyklustag:	ml Urin/24 Std:	mg Pregn. / 24 Std.:	mg Pregn. / 1 Urin:	Basaltemp. 6 Uhr:
1. Tag	530 ml	2,76 mg	5,21 mg	36,3° C
4.	420	1,15	2,73	- - -
7.	1200	2,56	2,13	36,8
9.	690	1,37	1,98	36,6
11.	700	1,83	2,61	36,5
13.	1150	1,93	1,68	36,8
15.	650	2,24	3,45	36,8
19.	640	3,94	6,15	37,2
22.	665	5,81	8,73	36,5
23.	1045	7,19	6,88	36,4
25.	600	3,08	5,14	36,2

Tabelle V: Pregnandiolbestimmung im Urin:

- Menstruationszyklus 5 -

Zyklustag:	ml Urin/24 Std:	mg Pregn. / 24 Std.:	mg Pregn. / 1 Urin:	Basaltemp. 6 Uhr:
1. Tag	1010 ml	- - -	- - -	37,1° C
4.	930	0,60 mg	0,65 mg	37,55
5.	800	0,36	0,45	37,55
7.	865	1,42	1,64	37,5
9.	620	0,30	0,40	37,3

Fortsetzung Tabelle V:

Zyklustag:	ml Urin/24 Std:	mg Pregn. / 24 Std.:	mg Pregn. / 1 Urin:	Basaltemp. 6 Uhr:
16. Tag	990 ml	0,80 mg	0,81 mg	36,5
19.	1130	0,80	0,71	36,5
21.	890	1,15	1,29	36,8
23.	720	0,64	0,89	36,9
25.	1220	0,81	0,66	37,3
27.	660	0,89	1,35	37,0
29.	650	1,99	3,06	36,8
32.	900	4,50	5,00	37,0
34.	765	5,15	6,73	37,3
36.	925	6,92	7,48	37,3

Tabelle VI: Pregnandiolbestimmung im Urin:
- normale Gravidität -

lfd. Nr.:	Patientin:	Alter:	Graviditätsmonat:	mg Pregn. / 24 Std.:
103	Wa.	23 J.	mens IX	7,5 mg
104	Pr.	22	VIII	5,2
105	De.	20	IX	21,8
106	St.	20	VIII	21,9
108	Pf.	21	VIII	15,0
109	Kre.	24	VIII	18,8
110	Kra.	22	IX	8,7
111	Da.	20	X	14,5
112	Ap.	20	X	14,0
113	Jä.	21	IX/X	13,1
114	Bö.	22	IX	14,8

Statistische Angaben zur Pregnandiolausscheidung/24 Std. in mg:

Durchschnittswert:	14,12
Varianz:	29,66
Standardabweichung:	5,45
Standardabweichung des Mittelwertes:	1,64
Variationskoeffizient:	0,39 = 39%.

Tabelle VII: Pregnanliolbestimmung im Urin:
- Menopause -

lfd. Nr.	Patientin:	Alter:	mg Pregn/24 Std.:	ml Urin/24 Std:
81	Sch.	54 J.	Ø	950 ml
82	Sch.	54	0,10 mg	1150
90	Sch.	54	0,08	900
84	Ha.	59	0,03	315
86	Ha.	59	0,08	650
88	Ha.	59	0,07	460
85	Sa.	65	0,24	435
87	Sa.	65	0,16	325
89	Sa.	65	0,14	580

Statistische Angaben zur Pregnanliolausscheidung/24 Std. in mg:

Durchschnittswert:	0,1
Varianz:	0,0052
Standardabweichung:	0,072
Standardabweichung des Mittelwertes:	0,024
Variationskoeffizient:	0,72 = 72%.

Vergleich mit den Mittelwerten der 1. Zyklushälfte der untersuchten Zyklen bei 5 Frauen mit dem t - Test bei nicht verbundenen Stichproben:

t = 3,281; signifikant bei P < 1%.

Tabelle VIII: Pregnanliolbestimmung im Urin:
- nach Ovariectomie -

lfd. Nr.:	Pat.:	Alter:	Diagnose/ Therapie:	Tag post oper.:	mg Pregn/ 24 Std.:	ml Urin/ 24 Std.:
91	Br.	40 J.	Mamma-Ca.; Radik-Op. Mamma, Ovariect. bds.	23. Tag	0,07 mg	1480 ml
73	Rö.	48	Collum-Ca; Totalexstirpat. Uterus u. beide Adnexe	37.	Ø	470

Fortsetzung Tabelle VIII:

lfd.Nr.:	Pat.:	Alter:	Diagnose/ Therapie:	Tag post oper.:	mg Pregn/ 24 Std.:	ml Urin/ 24 Std.:
92	Bö.	33	Mamma-Ca; Radik-Op. Mamma, Salpingoovarekt. bds.	7. Tag	0,25	415
94	Bö.	33		9.	0,10	580
95	Bö.	33		10.	0,06	555
96	Bö.	33		11.	Ø	1200
98	Bö.	33		16.	0,18	775
102	Bö.	33		23.	0,23	- -

Statistische Angaben zur Pregnandiolausscheidung/24 Std. in mg:

Durchschnittswert: 0,111

Varianz: 0,0096

Standardabweichung: 0,098

Standardabweichung des Mittelwertes: 0,0347

Variationskoeffizient: 0,88 = 88% .

Vergleich mit den Mittelwerten der 1. Zyklushälfte der untersuchten Zyklen bei 5 Frauen mit dem t - Test bei nicht verbundenen Stichproben:

t = 3,004; signifikant: bei P < 5%.

Vergleich mit den Werten von Frauen in der Menopause:

t = 0,025; nicht signifikant.

Anschließend sei noch die Berechnung der Mittelwerte und Streuungsmaße am Beispiel der Graviditätswerte (Tabelle VI) erläutert:

Mittelwert: $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_1 x_i$

$$\sum_1 x_i = 155,3$$

$$n = 11$$

$$\bar{x} = 14,12$$

Summe der Abweichungsquadrate:

$$S_{xx} = \sum_i x_i^2 - \frac{(\sum_i x_i)^2}{n}$$

$$\sum_i x_i^2 = 2489,17$$

$$(\sum_i x_i)^2 = 155,3^2 = 24118,09$$

$$\frac{(\sum_i x_i)^2}{n} = \frac{24118,09}{11} = 2192,55$$

$$S_{xx} = 2489,17 - 2192,55$$

$$S_{xx} = 296,62$$

Varianz: $s^2 = \frac{S_{xx}}{n-1}$

$$s^2 = 29,662$$

Standardabweichung:

$$s = + \sqrt{s^2}$$

$$s = 5,446$$

Standardabweichung des Mittelwertes:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = 1,642$$

Variationskoeffizient:

$$v = \frac{s}{\bar{x}}$$

$$v = \frac{5,446}{14,12}$$

$$v = 0,39 = 39\%$$

Hier sollen auch die angewandten statistischen Testverfahren kurz beschrieben werden:

F - Test:

Er dient zum Vergleich zweier Stichprobenvarianzen s_1^2 und s_2^2 . Der Vergleich findet durch Berechnung von

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{statt,}$$

unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade f_1 und f_2 . Dabei wird stets die kleinere Varianz als s_2^2 in den Nenner genommen. Der errechnete Wert von F wird mit dem Tafelwert für f_1 bzw. f_2 Freiheitsgrade und der vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit P verglichen. Überschreitet der errechnete den Tafelwert, so ist ein signifikanter Unterschied der verglichenen Stichprobenvarianzen s_1^2 und s_2^2 anzunehmen.

t - Test für nicht verbundene Stichproben:

Dieser Test dient zur Prüfung der Differenz der Mittelwerte zweier nicht verbundener Stichproben. Zunächst wird durch einen F-Test (s.o.) geprüft, ob sich die Varianzen beider Stichproben signifikant unterscheiden. Ist das nicht der Fall, dann berechnet man die Prüfgröße

$$t = \frac{|\bar{x}_2 - \bar{x}_1|}{s_d} ;$$

In dieser Formel bedeuten:

- $\bar{x}_1$: Mittelwert der ersten Stichprobe
- $\bar{x}_2$: Mittelwert der zweiten Stichprobe
- n_1 : Umfang der ersten Stichprobe
- n_2 : Umfang der zweiten Stichprobe
- s_d : Standardabweichung der Differenz $\bar{x}_2 - \bar{x}_1$;
sie wird berechnet nach der Formel:

$$s_d = \sqrt{\frac{S_{x_1x_1} + S_{x_2x_2}}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$$

Den berechneten Wert von t prüft man nach der t-Verteilung mit $f = n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden und der vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit P. Wenn die Widerspruchsgrenzen überschritten sind, gilt die Nullhypothese als widerlegt, ein Unterschied zwischen den Mittelwerten als "statistisch gesichert".

TEIL V:

DISKUSSION DER METHODIK

Die Dünnschicht-Chromatographie ist schon länger bekannt und auch angewandt worden. Größere Verbreitung fand sie aber vorwiegend in der jüngeren Zeit, da Stahl die Methode erheblich verbessert und vereinfacht hatte (68, 69, 70, 71, 72).

Die Dünnschichtchromatographie ist eine Adsorptionschromatographie. Ihr großer Vorteil ist der im Gegensatz zu anderen chromatographischen Methoden geringe Zeitaufwand, den sie erfordert, so daß sie auch als ausgesprochene Schnellmethode bezeichnet wird. Trotzdem trennt sie die Substanzen sehr gut, und die benötigte Substanzmenge ist recht klein. Das Arbeiten ist sauber und angenehm.

Waldi (73, 74, 75) hat die Dünnschichtchromatographie nach Stahl für Pregnan diolbestimmungen im Urin angewandt; diese Methode haben wir übernommen.

Die kleine Urinmenge von nur 20 ml, die zur Bearbeitung benötigt wird, gestattet eine sehr bequeme Handhabung aller Arbeitsgänge. Dies wurde ermöglicht durch die Ausarbeitung milder Hydrolysebedingungen durch Waldi (74), die ihm eine Rückgewinnung von bis zu 80% erbrachten. Es ist deshalb wichtig, die Temperatur des Urins während der Hydrolyse sorgfältig zu überwachen und nicht über 90°C ansteigen zu lassen; auch die Dauer der Hydrolyse von 10 Minuten soll nicht überschritten werden. Das Konstanthalten der Temperatur läßt sich durch Regulierung des Wasserbades leicht durchführen.

Nicht selten tritt bei der Extraktion mit Cyclohexan eine Emulsionsbildung auf, die die zur Vermeidung eines Pregnan diolverlustes wichtige scharfe Phasentrennung bedeutend erschwert. In nahezu jedem Fall konnte sie durch Zugabe weniger ml 1 n NaOH gefällt werden.

Einige Sorgfalt muß auf das Zubereiten und Auftragen der Adsorptionsschicht auf die Glasplatten verwandt werden. Eine ungleichmäßige, streifige oder Bläschen aufweisende Schicht verändert das Chromatogramm derart, daß eine genaue Auswertung nicht möglich ist. Wir haben deshalb, wenn eine Platte einmal nicht einwandfrei war, diese sofort von einer weiteren Bearbei-

tung ausgeschlossen. Da auch feine Schmutzpartikelchen und Fettspuren das Haften der Masse an der Glasplatte behindern, haben wir unmittelbar vor dem Auftragen die streichbereit auf die Schablone aufgelegten Platten, die also nicht mehr angefaßt werden mußten, mit etwas Aceton oder Alkohol abgerieben. Beim Auftragen selbst hat sich ein schnelles Abziehen des Streichgerätes unter Achtung auf gerade Ausrichtung der Schubkraft und Anfassen des Streichgerätes in der Mitte am besten bewährt. Es ist jedoch zu betonen, daß bei Beachtung dieser Einzelheiten, die schnell in Routine übergehen, dieser Prozeß keine besonderen Schwierigkeiten bereitet. Das Streichgerät und die Platten lassen sich durch Abspülen unter fließendem Wasser leicht reinigen.

Den geringen Substanzkonzentrationen entsprechend wurden die in der Arbeitsvorschrift von Stahl angegebenen Spezialpipetten für zu grob gehalten. Die Methode von Waldi arbeitet bei quantitativen Auswertungen mit der 'Agl'-Mikrometerspritze, deren kleinste Einheit wie schon erwähnt 0,0002 ml beträgt und bei Mengen von 0,01 ml mit einer Genauigkeit von $\pm 0,00005$ ml arbeitet. Wir fanden das Arbeiten mit diesem Präzisionsgerät auch bei kleinen Mengen recht genau. Die dazugehörige kleine Glasspritze muß nach jedem Gebrauch möglichst sofort gut gereinigt werden. Wir spülten sie zunächst mit etwas Wasser aus, dann mit Alkohol und zuletzt mit Aceton.

Beim Auftragen der Substanzlösung auf die Platte soll diese auf einen möglichst kleinen Bereich konzentriert werden. Dadurch wird die Trennung des Gemisches schärfer. Es ist deshalb günstig, nicht mehr als ein Volumen von 10' auf einmal aufzutragen und erst nach Verdunsten dieser Menge die nächsten 10' aufzubringen. Im Luftstrom eines Föhns läßt sich trotzdem zügig arbeiten. Wir stellten fest, daß das maximale auf einen Startpunkt auftragbare Volumen 350' beträgt; größere Mengen spülen die Kieselgel-Adsorptionsschicht um die Kanülenspitze herum fort, so daß die Lösung nicht mehr gut aufgesaugt wird. In der Mikrometerspritze verbleibt stets ein Teil der Lösung, der sich nicht mit Genauigkeit auftragen läßt; der Gegendruck, der durch das Zusammendrücken des am Spritzenendes befindlichen Gummiabschlußringes entsteht, ist zu groß. Unter Einberechnung dieser Verschleißmenge und des maximalen auf einen Startpunkt auftragbaren Lösungsvolumens ergab sich bei unseren Versuchen die Menge von 0,15 ml Chloroform als günstigstes Lösungsquantum, wenn es sich darum handelte, einen Extrakt auszuwerten, in dem nur ganz minimale Pregnandiolkonzentrationen erwartet wurden. Vor allem wurden die Urinextrakte von Frauen in der Menopause auf diese Art verarbeitet.

In der Anfangszeit trat zeitweise eine Störung bei der Entwicklung der Chromatogramme auf. Die Substanzpartikelchen wurden nicht gleichmäßig transpor-

tiert, so daß die zu bewertenden Pregnan diolflecken nach ihrer Sichtbarmachung eine verzerrte Form hatten und dadurch nur ungenaue Aussagen zuließen. Als wahrscheinliche Ursache erwies sich schließlich ein etwas reichliches Fettes des Ventilhahnes am Scheidetrichter. Die in den Extrakt gelangten Lipide scheinen offenbar das Chromatogramm in der beschriebenen Weise beeinflußt zu haben, denn nach Ausschaltung dieses Faktors traten die Störungen nicht mehr auf; einen Beweis dafür haben wir nicht unternommen.

Die Laufzeit des Chromatogramms kann eventuell noch etwas verkürzt werden (Waldi gibt 30 Minuten an), doch hielten wir die Trennung für besser, wenn wir die Zeit von 45 Minuten einhielten.

Das Besprühen der entwickelten Platten zur Sichtbarmachung der Flecken muß unter dem Abzug erfolgen. Denn im Gegensatz zur Papierchromatographie erlaubt die rein anorganische Adsorptionsschicht bei der Dünnschichtchromatographie die Anwendung recht aggressiver Reagenzien, die oft sehr charakteristische Färbungen ermöglichen (78 A). Das Sprühgerät soll die Lösung fein vernebeln, damit die Kieselgelschicht wirklich nur gleichmäßig durchfeuchtet und nicht durch grobe Tropfen heruntergeschwemmt wird. Es ist deshalb ein an eine Stickstoffflasche angeschlossener Druckluftsprüher mit feiner Düse verwendet worden.

Bei der Beschreibung der Methodik sind verschiedene Möglichkeiten der Auswertung angegeben worden. Am genauesten und konstantesten ist nach unserer Erfahrung die Beurteilung der hellen Braunfärbung der Flecken nach Erhitzen der mit o-Phosphorsäure besprühten Platte im Trockenschrank bei 110°C. Dabei kann die Zeit, wenn die Platte zwischendurch nicht zum Betrachten unter der UV-Lampe herausgenommen wird, von 1 Stunde auf etwa 30-40 Minuten verkürzt werden. Unseren Werten liegt diese Art der quantitativen Ablesung zugrunde. Zum Teil haben wir zusätzlich die unmittelbar anzuschließende Besprühung der noch heißen Platte mit äthanolischer Phosphormolybdätlösung vorgenommen, besonders dann, wenn man bei der Beurteilung zwischen zwei Werten schwankte, weil die dann blauschwarz gefärbten Flecken auf der gelb werdenden Umgebung sich deutlicher abheben. Außerdem lassen sich mit der Phosphormolybdätlösung andere Substanzen in fraglichen Fällen von Pregnan diol unterscheiden, da nur Pregnan diol und das jedoch höher laufende Allo-Pregnan diol sich sofort anfärben (74).

Die graugrünliche Fluoreszenz der ebenfalls mit o-Phosphorsäure besprühten und nur ca. 15 Minuten in den Trockenschrank gestellten Platte läßt sich auch ganz gut bewerten. Umständehalber und weil uns obige Methode - wie bereits erwähnt - am deutlichsten scheint, haben wir sie meistens unberücksichtigt gelassen.

Von Wal di (73, 74, 75) werden auch die weißen fettartigen Flecken, die sich unmittelbar bei der Besprühung mit o-Phosphorsäure bilden, zur Beurteilung herangezogen. Wir halten diese Methode jedoch im Vergleich zu den anderen für unterlegen; die Ablesungen variierten bei verschiedenen Untersuchern merkbar, und die Werte wichen auch oft von denen der anderen drei Methoden ab, die im wesentlichen stets übereinstimmten. Will man trotzdem eine nähere Betrachtung dieser fettartigen Flecken vornehmen, empfiehlt sich das Aufstellen der Platte vor einem schwarzen Hintergrund, zum Beispiel vor einer hinter einer Glasscheibe befindlichen schwarzen Papierfolie.

Erwähnt sei noch kurz die Besprühung mit Vanillin-Schwefelsäure. Die violetten Flecken sind prinzipiell zur Auswertung geeignet, doch nicht so prägnant wie die Braunfärbung. Da hierbei außerdem die anderen Möglichkeiten ausgeschlossen werden, haben wir diese Färbung nicht durchgeführt.

Die 0,25%ige Pregnandiol-Standard-Lösung haben wir in den Mengen von 2'-9' aufgetragen, wenn es sich um kleinere Pregnandiolkonzentrationen (Zyklus, Menopause) handelte. Am genauesten läßt sich der Bereich zwischen 4' und 7' ablesen. Bei Extrakten aus Schwangerenurin wird die Vergleichslösung in entsprechend größeren Mengen aufgetragen. Über den annähernden Pregnandiolgehalt orientierende Voruntersuchungen sind im allgemeinen nicht nötig. Sie ermöglichen aber gegebenenfalls eine ganz besonders präzise Auswertung.

Liest man für einen Extrakt mehrere Ergebnisse ab - entweder durch Auswertung mehrerer Farbreaktionen oder durch Auftragen derselben Extraktlösung in verschiedenen Mengen - so ist es bei ersterem besser, gleich den entsprechenden Durchschnittswert zu ermitteln und in die Umrechnungsformel einzusetzen, während es im zweiten Fall günstiger ist, jedes Einzelergebnis mit Hilfe der Formel in mg Pregnandiol/24 Std. umzurechnen und dann erst den Durchschnittswert zu bestimmen; es wäre sonst die umständliche Umrechnung auf einen Bezugswert nötig. Bei unseren Versuchsserien, die sich vorwiegend auf Zyklusuntersuchungen erstrecken, haben wir meistens einen Extrakt in drei steigenden Mengen aufgetragen.

Rückgewinnungsversuche:

Die von Stark und Schauder (79) unter Anwendung genau derselben Methodik und Apparatur vorgenommenen Recovery-Versuche ergaben nach Zugabe von 1,25 mg Pregnandiol zum Urin in 3 Bestimmungen eine Wiederauffindungsrate von 22%.

Wiederholungsversuche:

Die ebenfalls von Stark und Schauder (79) durchgeführten Wiederholungsversuche von je 10 Parallelbestimmungen von demselben Urin, einmal von einer schwangeren Frau und einmal von einer Nichtschwangeren, sollen hier mit ihren Einzelwerten wiedergegeben werden:

Nr.:	mg Pregn. /Tag (nicht gravid):	mg Pregn. /Tag (gravid):
1	1,1 mg	8,1 mg
2	1,2	7,7
3	1,1	10,6
4	1,0	10,2
5	1,3	8,1
6	1,3	9,6
7	1,0	8,1
8	1,5	9,5
9	1,3	8,1
10	1,3	9,5

Aus diesen Werten haben wir folgende statistische Daten errechnet:

	nicht gravid:	gravid:
Durchschnittswert:	1,21	8,95
Varianz:	0,0254	1,085
Standardabweichung:	0,159	1,042
Standardabweichung des Mittelwertes:	0,050	0,329
Variationskoeffizient:	0,13 = 13%	0,12 = 12%.

Die Übereinstimmung der beiden Variationskoeffizienten ist bemerkenswert.

Der Vergleich der Varianzen der Bestimmungsfehler bei den Wiederholungen im niedrigen (Nichtschwangeren-Urin) und im hohen (Schwangeren-Urin) Bereich mittels des F-Testes ergab:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1,085}{0,0254} = 42,649.$$

Das Ergebnis offenbart, daß die absolute Genauigkeit der Bestimmung im niedrigen Bereich größer ist als im hohen Bereich.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die Methode der Dünnschichtchroma-

tographie zur Bestimmung von Pregnandiol im Urin nach Waldi ein für die Klinik durchaus geeignetes Verfahren ist. Sie ist schnell, einfach und sauber in der Ausführung und zeitlich rationell gestaltbar. Bei gleichzeitiger Handhabung mehrerer Proben nebeneinander, was durch die kleinen Materialvolumina gut möglich ist, lassen sich 8-10 Untersuchungen pro Tag durchführen. Man kann sich schnell in die Methodik einarbeiten, ohne Spezialkenntnisse besitzen zu müssen. Die Spezifität und Genauigkeit sind so hoch, daß die Ergebnisse den klinischen Ansprüchen weitgehend Genüge leisten.

Shen, Francis und Kinsella (78) fanden bei einem Vergleich der mittels der Dünnschichtchromatographie nach Stahl erhaltenen Pregnandiolwerte mit den nach der Methode von Bongiovanni und Clayton (79 A) ermittelten Ergebnissen keinen signifikanten Unterschied; sie betonten ebenfalls den Vorteil der Schnelligkeit und Einfachheit der dünnschichtchromatographischen Methode.

TEIL VI:

BEDEUTUNG DER PREGNANDIOLBESTIMMUNG IN DER KLINIK FÜR DIAGNOSTISCHE, PROGNOTISCHE UND THERAPEUTISCHE ZWECKE

Der praktische Wert der Pregnandiolbestimmung für klinische Belange ist umstritten. Zwei Faktoren sind diesbezüglich von Bedeutung: Einmal die Frage der Ausführbarkeit einer befriedigend empfindlichen Pregnandiolbestimmungsmethode im gewöhnlichen klinischen Labor und zum anderen die Frage der Bedeutung und Aussagekraft der Pregnandiolausscheidungswerte für das Krankheitsgeschehen überhaupt.

Zu ersterem läßt sich sagen, daß die früheren Methoden für klinische Routineuntersuchungen ungeeignet waren, die in der letzten Zeit entwickelten Verfahren jedoch von hoher Empfindlichkeit sind und teilweise - wie zum Beispiel die dünnschichtchromatographische Methode - auch einfach in der Handhabung sowie angemessen im Zeit- und Arbeitsaufwand, so daß eine Anwendung im klinischen Labor durchaus möglich ist.

Der andere Faktor, die Bedeutung der Pregnandiolausscheidung, ist recht unterschiedlich, sowohl bei den verschiedenen Krankheitsbildern als auch bei den einzelnen Fällen innerhalb einer Krankheitsgruppe. In jedem Fall wichtig ist aber, daß man als Untersuchungsmaterial eine Mischprobe der gesamten über 24 Stunden gesammelten Urinmenge benutzt, um dann die Tagesausscheidung berechnen zu können; Einzelproben sind weitgehend mit der Gefahr der Falschdeutung belastet. Die zahlreichen von den verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß die Pregnandiolausscheidung schon normalerweise individuell wie auch bei derselben Patientin innerhalb verschiedener Zeitabschnitte variiert (80); dabei ist die individuelle Variabilität größer (81). Es ist deshalb erforderlich, daß mehrere Bestimmungen hintereinander ausgeführt werden, damit die Tendenz der Pregnandiolausscheidung deutlich wird (80, 82), denn die absolute Pregnandiolmenge hat aus den genannten Gründen nur einen begrenzten Wert für die Beurteilung des hormonellen Geschehens.

Die Normalwerte in der Schwangerschaft werden - wie auch die Normalwerte außerhalb der Schwangerschaft - von den einzelnen Autoren zum Teil verschieden angegeben. Dies ist vor allem durch die unterschiedliche Art der an-

gewandten Methodik bedingt, was bei einer Beurteilung stets berücksichtigt werden muß. Übereinstimmend wird ein zunächst mäßiger Anstieg der Preg-nandiolausscheidung während des ersten Trimesters berichtet, in dem oft das Niveau der Lutealphase des Zyklus nicht überschritten wird (82); die von Kaufmann, Westphal und Zander (82) gefundenen Mittelwerte liegen etwa zwischen 4 und 7 mg Pregndiol/24 Std. Um den 100. Tag etwa beginnt ein stärkerer Anstieg (82); dieser Zeitpunkt ist zu vergleichen mit der Übernahme der Progesteronsekretion durch die Placenta. Der weitere Verlauf wird als zunehmend ansteigend beschrieben bis ungefähr zur 37. Woche, wo die Ausscheidungskurve abflacht und etwas abfällt (83, 84). Die von Coyle und Mitarbeitern (83) sowie Russell und Mitarbeitern (84) gefundenen Werte liegen in der 36. -37. Woche im Mittel bei 40-50 mg/24 Std. Die mit der Methode von Venning bestimmten Pregndiolmengen liegen allgemein um 20-30 mg höher. Florenza und Mitarbeiter (85) berichteten über Pregndiolspiegel in den letzten 2 Wochen vor der Geburt, die etwa der Hälfte der Schwangerschaftshöchstwerte entsprechen, unter der Geburt beobachteten sie halb so hohe Werte wie am Schwangerschaftsende und im Wochenbett dann einen progressiven Abfall bis zum Erreichen des Niveaus der Lutealphase am 6. -7. Tag post partum.

Bei Mehrlingsschwangerschaften wurden, solange die Gravidität intakt war, erhöhte Werte im Vergleich zur Einzelschwangerschaft beobachtet (86, 87), was man sich durch die größere Placenta bzw. das größere Gesamtvolumen der Placenten erklärte (86); ein Absinken der Pregndiolausscheidung auf das Niveau der Einlingsschwangerschaft kann als ein mögliches Zeichen für eine drohende Fruchtausstoßung angesehen werden (87).

Die Anwendung der Pregndiolbestimmung als Schwangerschaftstest, wie sie vor allem von Guterma n (47) und Wal di (73, 74) empfohlen wurde, ist wegen der individuellen Schwankungsbreite nicht sehr zweckmäßig; mehrere Autoren haben diesbezüglich mit der Methode von Guterma n negative Erfahrungen gemacht (88, 89, 90). Reinhart und Barnes (88) berichteten über eine Fehlerquote von 25%; Kullander (89) hatte bei 89 Schwangeren zu etwa 38% negative Reaktionen, während es bei normalen Menstruationszyklen zu fälschlich positiven Ergebnissen kam; und Merivale (90) erhielt bei Untersuchungen an 105 Patientinnen nur in ca. 64% richtige Diagnosen. Guterma n's Angaben bestätigen konnte jedoch nur McCormack (91). Außerdem sind die in letzter Zeit in Gebrauch gekommenen Haemagglutinations-Teste auf Choriongonadotropin, so zum Beispiel der "Pregnosticon"-Test und der "Gravitest" dabei, nicht nur die Pregndiolbestimmungen, sondern auch die

bisher übliche "Aschheim-Zondek"-Reaktion zu verdrängen, deren hohe Treffsicherheit sie in gleichem Maße besitzen, dabei aber wesentlich schneller und einfacher auszuführen sind (92, 93). Der einzig mögliche Vorteil, den eine Schwangerschaftsdiagnostik mittels der Pregnandiolbestimmung bieten kann, liegt nach Ober und Kaiser (32) in ihrer Anwendung bei Fällen extremster Adipositas und fraglicher Gravidität im späteren Stadium, in dem die Choriongonadotropine bereits abgesunken sind.

In der pathologischen Schwangerschaft können die Pregnandiolbestimmungen dagegen recht aufschlußreich sein. Viele Autoren haben bei Abortus imminens ein deutlich paralleles Verhalten zwischen der Pregnandiolausscheidung und dem Abortgeschehen gefunden (94, 95, 96, 97, 97, 99, 100, 101). Wenn diese auch nicht zu alleiniger Stützung von Diagnose, Prognose und Therapie ausreichend ist, so hat sie doch als mitaussagende Untersuchung ihre Bedeutung. Russell und Mitarbeiter (102) sind der Ansicht, daß die Pregnandiolbestimmung eine Beurteilung des placentaren Funktionszustandes ermöglicht und benutzen sie bei entsprechendem klinischen Bild als zusätzliche Untersuchung bei der Frage nach der vorzeitigen Beendigung einer Schwangerschaft aus kindlicher Indikation. Langmade und Mitarbeiter (101) beobachteten eine Korrelation zwischen Pregnandiol und Abortprognose nur, wenn schon bestehende Abortsymptome nachzuweisen waren. Von Jayle und Mitarbeitern (99) wurde die Ausscheidung der Phenolsteroiden (Metaboliten der Oestrogene) und von Pregnandiol im Zusammenhang mit drohendem Abort untersucht; sie stellten fest, daß eine follikuläre Insuffizienz mit einer schlechteren Prognose verbunden ist als eine luteale Insuffizienz, und daß bestehende Blutungen bei normaler Hormonausscheidung nicht als Zeichen eines drohenden Abortes anzusehen sind. Šimko und Mitarbeiter (98) fanden dagegen bei drohendem Abort ein stärkeres Absinken der Pregnandiolausscheidung gegenüber der Oestrogenabnahme. Eine Kurve der mittleren Pregnandiolausscheidung und eine der kritischen klinischen Werte für jede Schwangerschaftswoche konstruierten Rawlings und Mitarbeiter (94) und wiesen an einem umfangreichen Krankengut die Brauchbarkeit dieser kritischen Kurve nach, die sie zu der Schlußfolgerung kommen ließ, daß beim Absinken unter die kritische Grenze sofort eine Progesterontherapie eingeleitet werden sollte.

Von besonders schlechter Prognose für die Schwangerschaft ist eine absinkende Tendenz der Pregnandiolwerte, während ständig niedrige Werte oder mehrmals in größeren Zeitabständen abfallende und wieder ansteigende Werte nicht unbedingt eine intakte Schwangerschaft ausschließen. Selbstverständlich können entsprechend der Vielfalt der Abortätiologie auch bei normalen Pregnandiolwerten Aborte vorkommen; Eton und Short (86) berichten zum Beispiel über einige Fälle von Abortus imminens bei unverändertem Blutprogesteronspiegel.

Die naheliegende Therapie bei niedriger Pregnandiolausscheidung und Verdacht auf drohenden Abort oder Abortanamnese bezüglich vorausgegangener Schwangerschaften ist eine Progesteronsubstitution, über die auch, meist in Kombination mit einer Oestrogenbehandlung, von vielen Seiten gute Erfolge berichtet werden (97, 103, 104). Morgan und Mitarbeiter (97) beobachteten bei niedrigen Pregnandiolwerten in 40 unbehandelten Fällen eine Verlustrate der Kinder von 72%, während sie in 100 mit Progesteron behandelten Fällen nur 13% betrug. Und De Watteville (105) stellte fest, daß die besten Erfolge der Progesterontherapie des drohenden Abortes in den ersten drei Monaten zu erzielen sind und vermutet, daß die durch ungenügende Progesteronproduktion bedingten Aborte in dieser Zeit häufiger sind als bekannt ist; die zum Teil nicht befriedigenden Erfolge schreibt er einer zu kleinen Progesterondosierung zu. Ebenso halten Jayle und Robey (103) sowie Jacobson (104) den rechtzeitigen Beginn der Hormonbehandlung bei noch intaktem Trophoblasten als Voraussetzung für einen erfolgreichen Ausgang der Therapie. Auch beim habituellen Abort ist die Progesteronbehandlung angebracht; Foley (106) erreichte mit 17 α -Hydroxy-Progesteroncaproat bei 120 Fällen in 81% die Geburt eines lebenden Kindes, wogegen dies bei denselben Frauen in den vorangegangenen Schwangerschaften nur zu 15% eingetreten war. Kupperman und Lefkovic (107) erhielten ähnliche Ergebnisse; die unter der Progesterontherapie ansteigende Pregnandiolausscheidung zeigte aber bezüglich ihrer absoluten Quantität nicht immer eine sichere Beziehung zum klinischen Verlauf.

Außer für die Diagnose und Prognose des Abortgeschehens, wobei für letztere die Tendenz der Pregnandiolausscheidung unter der Behandlung aufschlußreich ist (100), ist die Bestimmung von Pregnandiol und der Phenolsteroiden auch für eine vorbeugende Therapie späterer Schwangerschaften bei rezidivierendem Abort hormoneller Genese von Bedeutung (103).

Es ist festzustellen, daß im Verhältnis zu diesen vielen positiven Berichten negative Beobachtungen - wie der Vergleich alternierender Fälle von drohender Frühgeburt unter Progesterontherapie und konservativer, aus Bettruhe bestehender Behandlung, bei dem Fuchs und Stakemann (108) keinen Unterschied hinsichtlich der Erfolgsquote fanden, ferner die Angaben von Jones und Wilkins (109) über Maskulinisierungs-Mißbildungen der äußeren Genitalien bei genetisch weiblichen Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft längere Zeit mit synthetischen Gestagenen oder Progesteron behandelt worden waren - relativ selten sind, so daß sie die Bedeutung der Progesteronbehandlung des Abortus imminens und damit auch der Pregnandiolbestimmung nicht wesentlich einschränken können.

Im Zusammenhang mit einer fraglichen Übertragung erlaubt die Pregnandiolbestimmung nach Kornowska und Mitarbeitern (96) bei hohen Werten mit der Geburtseinleitung noch abzuwarten, niedrige Werte aber deuten auf eine Lebensgefahr für das Kind hin.

Übereinstimmende Untersuchungen der Pregnandiolausscheidung bei Schwangerschaftsgestosen haben ergeben, daß auch hierbei die Werte neben denen der Oestrogene merklich erniedrigt sind (110, 111, 112, 113). Dorigo (110) fand bei Präeklampsie eine sowohl absolute wie auch in Bezug auf das Placentagewicht bis nahe auf die Hälfte verminderte Ausscheidung; er nimmt an, daß das placentare Progesteron in Corticosteroide umgewandelt wird.

Von Kankaanrinta und Forssell (111) sowie von Furuhielm (112) wird die verminderte Pregnandiolexkretion ebenfalls als ein gewisser Index für die Schwangerschaftstoxikose angesehen, letzterer hält allerdings die Oestriolausscheidung für noch aufschlußreicher. Nach De Watterville (53) ist die Pregnandiolausscheidung ein prognostischer Hinweis für das Kind, da bei seinen Untersuchungen an präeklaptischen Frauen die überwiegende Zahl der unterentwickelt oder tot geborenen Kinder von Müttern mit einem Pregnandiolspiegel unter 20 mg/24 Std. stammten. Trotz Verminderung des Urin-Pregnandiols fanden Simmer, H. und Simmer, L. (114) und Maeyama und Mitarbeiter (113), daß die Blutprogesteronspiegel bei Gestosen der Norm entsprachen; Maeyama und Mitarbeiter erwähnen hierzu die Möglichkeit eines bei regelrechter Progesteronproduktion herabgesetzten Progesteronabbaus, der durch eine Störung des Leberstoffwechsels bedingt sein könne.

Die Therapie der Eklampsie mit Progesteron brachte nach Untersuchungen von Borsö (115) bei 18 Patientinnen einen guten Erfolg; es kam nur zu einem kindlichen Todesfall; er behandelte auch die Präeklampsie mit kleineren Dosen Progesteron, denn dieses scheint einen gewissen Einfluß auf den Kohlehydratstoffwechsel zu haben. Panella (116) beobachtete, daß bei normalen nichtschwangeren Frauen durch Injektion von 10 mg Progesteron der Blutzuckerspiegel von durchschnittlich 99% auf 95% gesenkt wurde und außerdem die Toleranz gegenüber Traubenzucker anstieg. Besonders deutlich war diese Wirkung bei älteren Frauen zwischen 50 und 70 Jahren und bei Patientinnen mit Diabetes mellitus.

Die Pregnandiolausscheidung bei diabetischen Schwangeren ließ nach Untersuchungen von Pece (117) keine wesentliche Abweichung von der Norm erkennen.

Ein anderer Anwendungsbereich für die klinische Pregnandiolbestimmung ist der

Menstruationszyklus und seine Störungen. Als Normalwerte geben Keller und Hauser (76) in der Follikelphase eine Ausscheidung bis zu 2 mg/Tag an und nach der Ovulation einen lutealen Anstieg bis zu maximal 13 mg/Tag mit einem Absinken kurz vor Beginn der nächsten Menstruation. Klopfer (77) berichtet **etwas niedrigere** Werte: In der Follikelphase liegen seine Werte bei 1 mg/Tag und in der Lutealphase zwischen 2 und 3 mg bei "juvenilen" Zyklen in den ersten Jahren nach der Menarche und zwischen 4 und 6 mg bei "adulten" Zyklen. Auch in der Menopause, bei Männern und bei Kindern wird Pregnan diol im Urin ausgeschieden. Bestimmungen mit der Methode von Klopfer ergaben als mittlere Tagesausscheidung in der Menopause 0,63 mg (60), bei Männern 0,92 mg (60) und für Kinder 0,75 mg bei Knaben sowie 0,72 mg bei Mädchen (118). Die von Keller und Hauser (76) für Männer und Frauen in der Menopause angegebenen Werte sind mit 2 mg/Tag wiederum etwas höher. Das von Kindern, Männern und Frauen in der Menopause ausgeschiedene Pregnan diol stammt nach heutiger Anschauung aus der Nebenniere, wie auch die Tatsache zeigt, daß bei adrenalectomierten Kastratinnen kein Pregnan diol nachweisbar ist (76).

Bei pathologischen Menstruationszyklen kann die Pregnan diolbestimmung zu der Feststellung benutzt werden, ob eine Ovulation überhaupt stattgefunden hat oder ob es sich um anovulatorische Zyklen handelt, bei denen die Blutung dann durch das proliferierte Endometrium bedingt ist. Eine bestehende Amenorrhoe läßt sich durch eventuellen Ausschluß einer normalen Corpus luteum-Phase erhellen; jedoch sind normale oder gar erhöhte Pregnan diolwerte nicht für eine normale Corpus luteum-Funktion beweisend, denn insbesondere psychische Stresszustände, ferner hormonaktive Tumoren des Ovars und Carcinome oder Hyperplasien der Nebennierenrinde sowie Leberaffektionen, Gallenstauungen und ACTH-Applikationen können diese Werte hervorrufen (76), wie zum Beispiel Twombly (119) an einem 15jährigen amenorrhoeischen Mädchen, das ein Luteom hatte, zeigte. Es muß allerdings beachtet werden, daß bei den Zyklusstörungen eine Curettage oftmals aufschlußreichere Ergebnisse liefert, insbesondere bei nicht eindeutig zu beurteilenden Pregnan diolwerten; beide Untersuchungen kombiniert ergeben aber wertvolle diagnostische und prognostische Daten (32).

Zum Schluß sei noch auf eine rein therapeutische Anwendungsmöglichkeit des Pregnan diols eingegangen. Hinsichtlich der hormonellen Allergie als Ursache verschiedenster gynäkologischer Störungen berichtet Ojima (120) über ein Krankengut von 271 Patientinnen, die er unter der Annahme, daß Pregnan diol als Allergen wirken kann, mit kleinen Dosen von 2 γ Pregnan diol 1-2 mal täglich bis zur Besserung ihrer Erscheinungen zu desensibilisieren versuchte.

Er erzielte mit dieser Behandlung gute Ergebnisse; die Erfolgsquote betrug bei prämenstruellen Beschwerden 81%, bei Dysmenorrhoe 87%, bei Mastopathie 100% und bei menstruellem Exanthem und Akne 94%; ähnlich lagen die Ergebnisse auch bei Pruritus vulvae.

Bei Beachtung all dieser Berichte über Möglichkeiten, Erfolge und auch Mißerfolge in der Anwendung der Pregnandiolbestimmung für klinische Fragestellungen und Bedürfnisse läßt sich sagen, daß die Ergebnisse zum Teil differieren, daß sich aber trotzdem die Tendenz zu einer positiven, Bedeutung zumessenden Bewertung dieser Hormonuntersuchung abzeichnet, wenn man sie im Rahmen ihrer begrenzten Möglichkeiten einsetzt und nicht voreilig aus Einzelwerten verallgemeinernde Schlußfolgerungen zu ziehen versucht.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem chronologischen Überblick über die gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung von Pregnandiol im Urin wird die Anwendung der von Waldi für die Pregnandiol-Bestimmung bearbeiteten Dünnschichtchromatographie nach Stahl zur Untersuchung der Pregnandiolausscheidung im Urin beschrieben und diskutiert. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse (normale Menstruationszyklen, normale Gravidität, Menopause, Ovariectomie) differieren nicht wesentlich von den Pregnandiolwerten, die mit anderen, in der letzten Zeit entwickelten Methoden ermittelt wurden. Die Einfachheit und Schnelligkeit der dünnschichtchromatographischen Methode zur Pregnandiolbestimmung und damit ihre besondere Eignung für klinische Routineuntersuchungen werden betont.

Anschließend wird noch die Anwendbarkeit der Pregnandiolbestimmung in der klinischen Diagnostik, Prognostik und Therapie erörtert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Fraenkel, L.: Die Function des Corpus luteum.
Arch. Gynaek. 68, 1903, S.438 ff.
2. Fraenkel, L.: Neue Experimente zur Function des Corpus luteum.
Arch. Gynaek. 91, 1910, S. 705 ff.
3. Schröder, R. und Goerbig, F.: Über Substanzen, die das Genitale wirksam zum Wachsen anregen.
Z. Geburtsh. Gynäk. 83, 1921, S. 764 ff.
4. Schröder, R.: Der mensuelle Genitalzyklus des Weibes und seine Störungen. Veit-Stoeckel, Handbuch Gynäk., 3. Aufl., Verlag J. F. Bergmann, München, Bd. I/2, 1928, S. 306 ff.
5. Corner, G. W.: Physiology of the corpus luteum. I. The effect of very early ablation of the corpus luteum upon embryos and uterus.
Am. J. Physiol. 86, 1928, S. 74 ff.
6. Corner, G. W. and Allen, W. M.: Physiology of the corpus luteum. II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum.
Am. J. Physiol. 88, 1929, S. 326-339
7. Clauberg, C.: Das Hormon des Corpus luteum.
Zentbl. Gynäk. 54, 1930, S. 7 ff.
8. Butenandt, A., Westphal, U. und Hohlweg, W.: Über das Hormon des Corpus luteum.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 227, 1934, S. 84 ff.
9. Slotta, K. H., Rusching, H. und Fels, E.: Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum.
Ber. dt. chem. Ges. 67, 1934, S. 1270 ff.
10. Butenandt, A. und Westphal, U.: Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpus-luteum-Hormons.
Ber. dt. chem. Ges. 67, 1934, S. 1440 ff.
11. Butenandt, A., Westphal, U. und Cöbber, H.: Über einen Abbau des Stigmasterins zu corpus-luteum-wirksamen Stoffen; ein Beitrag zur Konstitution des Corpus-luteum-Hormons.
Ber. dt. chem. Ges. 67, 1934, S. 1611 ff.
12. Aschheim, S. und Zondek, B.: Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren.
Klin. Wschr. 6, 1927, S. 1322 ff.

13. Butenandt, A.: Über Pregnandiol, einen neuen Sterin-Abkömmling aus Schwangeren-Harn. Ber. dt. chem. Ges. 63, 1930, S. 659 ff.
14. Marrian, G. F.: The chemistry of oestrin. I. Preparation from urine and separation from an unidentified solid alcohol. Biochem. J. 23, 1929, S. 1090 ff.
15. Butenandt, A.: Über das Pregnandiol, einen neuen Sterinabkömmling aus Schwangeren-Harn (2. Mitteilg.). Ber. dt. chem. Ges. 64, 1931, S. 2529 ff.
16. Butenandt, A. und Mamoli, L.: Über allo-Pregnanol-(3)-on-(20). einen Begleitstoff des Corpus-luteum-Hormons. Ber. dt. chem. Ges. 67, 1934, S. 1897 ff.
17. Venning, E. M., and Browne, J. S. L.: Isolation of a water-soluble pregnandiol complex from human pregnancy urine. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34, 1936, S. 792 ff.
18. Forbes, T. R. and Hooker, C. W.: Inactivity of Bound Plasma Progesterone. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 70, 1949, S. 682 ff.
19. Marti, M., Schindler, O. und Bühner, R.: Progesteron im Blut bei gesunden und lebergeschädigten Frauen. Gynaecologia 152, 1961, S. 265-269.
20. Patrini, G.: Sulla scomparsa del progesterone nel sangue in donne normali ed epatopazienti. Quad. Clin. ostet. ginec. 18, 1963, S. 87 ff.
21. Venning, E. H. and Browne, J. S. L.: A study of the metabolism of progesterone. Am. J. Physiol. 123, 1938, S. 209 ff.
22. Buxton, C. L. and Westphal, U.: Recovery of pregnandiol in urine of men treated with progesteron. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 41, 1939, S. 284 ff.
23. Engel, L. L., Thorn, G. W. and Lewis, R. A.: The urinary excretion of steroid compounds, I. normal male subjects. J. biol. Chem. 137, 1941, S. 205 ff.
24. Westphal, U.: Über den Nachweis von Pregnandiolglucuronid im Harn normaler Frauen und Männer. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 281, 1944, S. 14 ff.
25. Westphal, U.: Über die Umwandlung des Progesterons in Pregnandiol beim Kaninchen. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 273, 1942, S. 1-12
26. Westphal, U.: Über die reaktive Umwandlung des Desoxy-corticosteron zu Pregnandiol im Organismus des Kaninchens. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 273, 1942, S. 13 ff.

27. Zarrow, M. X., Hisaw, F. L. and Bryans, F.: Conversion of desoxycorticosterone acetate to progesterone in vivo. *Endocrinology* 46, 1950, S. 403 ff.
28. Beall, D. and Reichstein, T.: Isolation of progesterone and allopregnanolone from the adrenal. *Nature, Lond.* 142, 1938, S. 479 ff.
29. Adezati, L. ed Polleri, A.: Progesterone e biosintesi cortinica. *Fisiologia, clinica e terapia.* *Annali Ostet. Ginec.* 82, 1960, S. 359-412
in: *Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* 73, 1961, S. 149
30. Sweat, M. L., Berliner, D. L., Bryson, M. J., Nabors, C., Haskell, J. and Holmstrom, E. G.:
The synthesis and metabolism of progesterone in the human and bovine ovary. *Biochim. biophys. Acta* 40, 1960, S. 289 ff.
31. Davis, M. E., Plotz, E. J., Lupu, C. I. and Ejarque, P. M.:
The metabolism of progesterone and its related compounds in human pregnancy. *Fert. Steril.* 11, 1960, S. 18 ff.
32. Ober, W. B. and Kaiser, G. A.: Pregnanediol. *Methods, Limitations, and Applications.* *Am. J. clin. Path.* 35, 1961, S. 297 ff.
33. Ryan, K. J.: The conversion of pregnenolone-7-³H and progesterone-4-¹⁴C to oestradiol by a corpus luteum of pregnancy. *Acta endocr.* 44, 1963, S. 81-89.
34. Bloch, K.: The biological conversion of cholesterol to pregnanediol. *J. biol. Chem.* 157, 1945, S. 661 ff.
35. Huebner, C. F., Overman, R. S. and Link, K. P.: The synthesis of pregnanediol 3- β - α -glucuronide. *J. biol. Chem.* 155, 1944, S. 615 ff.
36. Pearlman, W. H. and Cerceo, E.: The isolation of pregnanol-3(α)-one-20, pregnanediol-3(α), 20(β), and etiocholanediol-3(α), 17(β) from the bile of pregnant cows. *J. biol. Chem.* 176, 1948, S. 847
37. Sandberg, A. A. and Slaunwhite, W. R. jr.: The metabolic fate of C¹⁴progesterone in human subjects. *J. clin. Endocr. Metab.* 18, 1958, S. 253 ff.
38. Venning, E. H.: Gravimetric method for the determination of sodium pregnanediol glucuronide. *J. biol. Chem.* 119, 1937, S. 473 ff.
39. Venning, E. H.: Further studies on the estimation of small amounts of sodium pregnanediol glucuronide in urine. *J. biol. Chem.* 126, 1938, S. 595 ff.

40. Allen, W.M. and Viergiver, E.: A titrimetric method for the determination of sodium pregnanediol glucuronide in the urine of pregnant women. *J. biol. Chem.* 141, 1941, S. 837 ff.
41. Peterson, D.H., Hoskins, W.H., Coffman, J.R. and Koch, F.C.: The nature of the physiologically inactive form of androgens in human urine. *J. biol. Chem.* 123, 1938, S. xciii
- 41A. Cohen, S.L. and Marrian, G.F.: The isolation and identification of a combined form of oestriol in human pregnancy urine. *Biochem. J.* 30, 1936, S. 57 ff.
42. Sutherland, E.S. and Marrian, G.F.: The preparation of nonketonic and ketonic sodium glucuronide from the sodium pregnanediol glucuronide of human pregnancy urine: the isolation of pure sodium pregnane-3(α), 20(α)-diol glucuronide. *Biochem. J.* 41, 1947, S. 193 ff.
43. Marrian, G.F. and Gough, N.: The isolation of pregnane-3(α)-ol-20-one from the hydrolysis products of sodium pregnanediol glucuronide. *Biochem. J.* 40, 1946, S. 376 ff.
45. Astwood, E.B. and Jones, G.E.S.: A simple method for the quantitative determination of pregnanediol in human urine. *J. biol. Chem.* 137, 1941, S. 397-407
46. Talbot, N.B., Berman, R.A., McLachlan, E.A. and Wolfe, J.K.: Colorimetric determination of neutral steroids (hormones) in 24-hour sample of human urine (pregnanediol; total, alpha and beta alcoholic, and non-alcoholic 17-ketosteroids). *J. clin. Endocr. Metab.* 1, 1941, S. 668-673
47. Guterman, H.S.: A human pregnancy test based upon color reaction of pregnanediol in the urine. *J. clin. Endocr. Metab.* 4, 1944, S. 262 ff.
48. Guterman, H.S.: Further observations on the value of the pregnanediol test for pregnancy. *J. clin. Endocr. Metab.* 5, 1945, S. 407-411
49. Guterman, H.S. and Schroeder, M.S.: A simplified technique for the quantitative colorimetric estimation of pregnanediol in urine. *J. Lab. clin. Med.* 33, 1948, S. 356-366
50. Sommerville, I.F., Gough, N. and Marrian, G.F.: The quantitative determination of small amounts of pregnanediol in human urine. *J. Endocr.* 5, 1948, S. 247 ff.
51. Huber, D.: Determination of pregnanediol in urine for diagnostic purposes. *Biochem. J.* 41, 1947, S. 609 ff.
52. De Watteville, H., Borth, R. and Gsell, M.: Effect of dl- α -tocopherol acetate on progesterone metabolism. *J. clin. Endocr. Metab.* 8, 1948, S. 982 ff.

53. De Watteville, H.: Pregnanediol determinations in the clinic and in research. *J. clin. Endocr. Metab.* 11, 1951, S. 251 ff.
54. Stimmel, B. F.: A procedure for concomitant photometric estimation of pregnanediol and estrogens in human urine. *J. clin. Endocr. Metab.* 12, 1952, S. 371 ff.
55. Chaney, A. L., McKee, W. E., Fischer, R. H. and McCollgan, S. P.: A new and simplified procedure for the determination of free pregnanediol in urine, and its evaluation. *J. clin. Endocr. Metab.* 12, 1952, S. 735 ff.
56. Cohen, S. L.: The hydrolysis of steroid glucuronides with calf spleen glucuronidase. *J. biol. Chem.* 192, 1951, S. 147 ff.
57. Goldfine, M. M. and Cohen, S. L.: Glucuronidase hydrolysis for pregnanediol assays. *Endocrinology* 52, 1953, S. 597 ff.
58. Buxton, C. L.: Pregnanediol determination as an aid in clinical diagnosis. *Am. J. Obstet. Gynec.* 40, 1940, S. 202 ff.
59. Smith, O. W.: The quantitative determination of urinary pregnanediol in pregnant women: the influence of the method upon results. *J. clin. Endocr. Metab.* 10, 1950, S. 496-510
60. Kloppe, A., Michie, E. A. and Brown, J. B.: A method for the determination of urinary pregnanediol. *J. Endocr.* 12, 1955, S. 209 ff.
61. Eberlein, W. R. and Bongiovanni, A. M.: A paper chromatographic method for the measurement of pregnanediol in urine. *J. clin. Endocr. Metab.* 18, 1958, S. 300 ff.
62. Eberlein, W. R.: A compact apparatus for ascending paper chromatography. *J. clin. Endocr. Metab.* 17, 1957, S. 1476 ff.
63. Katzenellenbogen, E. R., Dobriner, K. and Kritchevsky, T. H.: Separation of steroid hormones and their metabolites by partition type chromatography. *J. biol. Chem.* 207, 1954, S. 315-321
64. Allen, W. M.: A simple method for analyzing complicated absorption curves, of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. clin. Endocr. Metab.* 10, 1950, S. 71 ff.
65. Lipp, G.: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung von Pregnanediol im Urin. *Acta endocr.* 33, 1960, S. 501 ff.
66. Staub, M. C., Gaitan, E. and Dingman, J. F.: A simple method for the determination of urinary pregnanediol and pregnanetriol by Glass Fiber Paper Chromatography. *J. clin. Endocr. Metab.* 22, 1962, S. 87 ff.

67. Jones, G.E.S., Turner, D., Sarlos, I.J., Barnes, A.C. and Cohen, R.: The determination of urinary pregnanediol by gas liquid chromatography. *Fert. Steril.* 13, 1962, S. 544 ff.
68. Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. *Pharmazie* 11, 1956, S. 633 ff.
69. Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, II. Mitteilung. Standardisierung, Sichtbarmachung, Dokumentation. *Chemikerzeitung* 82, 1958, S. 323 ff.
70. Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, IV. Mitteilung. Einsatzschema, Randeffect, "saure und basische" Schichten, Stufentechnik. *Arch. Pharm.*, Berl. 8/9, 1959, S. 411 ff.
71. Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie in der Pharmazie (zusammenfassende Darstellung). *Pharm. Rdsch.*, Hamb. 2, 1959, S. 1 ff.
72. Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962
73. Waldi, D. und Munter, F.: Ein Frühschwangerschaftsnachweis mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. *Medizina exp.* 3, 1960, S. 45 ff.
74. Waldi, D.: Einfache quantitative Schnellbestimmung von Pregnanediol auf Dünnschichtplatten zum Frühschwangerschaftsnachweis und zur Überwachung des Cyclus bei der Frau. *Klin. Wschr.* 40, 1962, S. 827 ff.
75. Waldi, D.: Dünnschichtchromatographie im ärztlichen Laboratorium. *Ärztl. Lab.* 9, 1963, S. 221 ff.
76. Keller, M. und Hauser, A.: Zur Beurteilung der Pregnanidiolausscheidung in der zweiten Zyklushälfte. *Gynaecologia* 149, 1960, S. 337 ff.
77. Klopfer, A.L.: The excretion of pregnanediol during the normal menstrual cycle. *J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw.* 64, 1957, S. 504 ff.
78. Shen, N.H.C., Francis, F.E., Kinsella, R.A.: Thin-layer chromatography of 17-ketosteroids, pregnanediol and pregnanetriol in urine. *J. Lab. clin. Med.* 60, 1962, S. 1017 ff.
- 78A. Arbeitsvorschrift für die Dünnschicht-Chromatographie nach Prof. Dr. E. Stahl. C. Desaga GmbH, Heidelberg, Hauptstr. 60
79. Schauder, P.: Die Ausscheidung von Pregnanediol bei gesunden Schwangeren nach fortlaufender hoher Aldosterongabe. *Med. Inaug. Diss. Mainz*, Nov. 1965
- 79A. Bongiovanni, A.M. and Clayton, G.W. jr.: A simplified method for the routine determination of pregnanediol and pregnanetriol in urine. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 94, 1954, S. 180-186

80. Loraine, J. A.: Clinical Application of Hormone Essay. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1958, S. 226-227,
in: Ober, W. B. and Kaiser, G. A.: Pregnanediol. Methods, Limitations, and Applications.
Am. J. clin. Path. 35, 1961, S. 297 ff.
81. Coyle, M. G., Mitchell, F. L., Paine, C. G. and Russell, C. S.: Errors in the determination of urinary pregnanediol.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 62, 1955, S. 291 ff.
82. Kaufmann, C., Westphal, U. und Zander, J.: Untersuchung über die biologische Bedeutung der Ausscheidungsprodukte des Gelbkörperhormons. Arch. Gynaek. 179, 1951, S. 247 ff.
83. Coyle, M. G., Mitchell, F. L. and Russell, C. S.: A report on the chromatographic assay of urinary pregnanediol in pregnancy.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 63, 1956, S. 560 ff.
84. Russell, C. S., Paine, C. G., Coyle, M. G. and Dewhurst, C. J.: Pregnanediol excretion in normal and abnormal pregnancy.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 64, 1957, S. 649 ff.
85. Florenza, E., Suter de Martin, M., Turco, J. y Pereira: Pregnanodiol al final del embarazo, parto y puerperio. (Pregnanediol am Ende der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett.) Obstet. Ginec. lat. -am. 19, 1961, S. 585 ff.
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 80, 1962/63, S. 83
86. Eton, B. and Short, R. V.: Blood progesterone levels in abnormal pregnancies. J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 67, 1960, S. 785 ff.
87. Rawlings, W. J. and Krieger, V. I.: Pregnanediol excretion in multiple pregnancy. Med. J. Aust. 47, 1960, S. 297 ff.
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 74, 1961, S. 180
88. Reinhart, H. L. and Barnes, A. C.: An evaluation of the Guterman pregnancy test in clinical practice.
J. clin. Endocrin. Metab. 6, 1946, S. 664 ff.
89. Kullander, S.: Investigations into the determination of pregnanediol according to the Guterman method.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 55, 1948, S. 159 ff.
90. Merivale, W. H. H.: The Guterman test for pregnancy.
Brit. Med. J. 1, 1948, S. 685 ff.
91. McCormack, G.: A comparison of the color chemical test with the Friedman modification of the Aschheim-Zondek test.
Am. J. Obstet. Gynec. 51, 1946, S. 722 ff.
92. Lachnit-Fixson, U.: Klinische Erfahrungen mit dem Pregnosticon-Schwangerschaftstest. Ärztl. Lab. 10, 1964, S. 120-126

93. Schmidt, V.: Pregnancy tests. Experience with an immunological latex-agglutination reaction ("Gravindex" Ortho) compared with two haemagglutination reactions ("Pregnosticon", Organon and "Gravitest", Orion). Nord. Med. 72, 1964, S. 922-925
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 89, 1965, S. 65
94. Rawlings, W. J. and Krieger, V. I.: The value of the pregnanediol excretion test in the prognosis of abortion.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 66, 1959, S. 905 ff.
95. Timonen, S. und Göltner, E.: Die Bedeutung der vaginalen Hormonzytologie und der Pregnanoliasscheidung im Urin für die Prognose des Abortus imminens. Zentbl. Gynäk. 81, 1959, S. 1263 ff.
96. Komorowska, A. and Oszczygiel, A.: The diagnostic value of Málek-Lenner-Tichy pregnandiol determination method in pregnancy. Preliminary report. Endokr. pol. 11, 1960, S. 173-184
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 77, 1962, S. 279
97. Morgan, J., Hackett, W. R. and Hunt, T.: The place of progesterone in the treatment of abortion.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 67, 1960, S. 323 ff.
98. Šimko, J. und Pačín, J.: Das Verhältnis in der Ausscheidung von Pregnanediol und Oestrogenen bei drohender Fehlgeburt.
Bratisl. lék. Listy 40, Bd. 2, 1960, S. 453 ff.
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 74, 1961, S. 177
99. Jayle, M. F., Roussange, G., Veyrin-Forrer, F. et Mège, F.: Intérêt clinique des dosages du prégnandiol et des phénolstéroïdes au début de la grossesse. Gynéc. Obstét 59, 1960, S. 47 ff.
100. Palmer, R. et Robel, J.: Intérêt clinique du dosage concomitant du prégnandiol, des phénolstéroïdes et des 17-cétostéroïdes chez les femmes sujettes aux avortements du 1^{er} trimestre.
Cah. Coll. Méd. Hôp. Paris 1, 1960, S. 551-555
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 78, 1962, S. 275
101. Langmade, C. F., Notrica, S., Demetriou, J. and Ware, A. G.: Pregnanediol excretion in threatened abortion.
Am. J. Obstet. Gynec. 81, 1961, S. 1149-1156
102. Russell, C. S., Dewhurst, C. J. and Blakey, D. H.: The pregnanediol excretion in suspected placental insufficiency.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 67, 1960, S. 1 ff.
103. Jayle, M. F. et Robey, M.: Intérêt du dosage du prégnandiol et des phénolstéroïdes pour le diagnostic et le traitement des avortements récidivants d'origine hormonale.
Presse med. 70, 1962, S. 1193 ff.

104. Jacobson, B.D.: Abortion: its prediction and management. Critical evaluation of newer progestational agents and clinical report on their use in more than 1000 patients, based on observations of cervical mucus. *Fert. Steril.* 11, 1960, S. 399 ff.
105. De Watteville, H.: Valeur du traitement par la progesterone au cours de menaces d'avortements. *Annali Ostet. Ginec.* 82, 1960, S. 484 ff.
106. Foley, J.J.: The use of intramuscular progesterone in pregnancy with special reference to vaginal aplasia. *J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw.* 70, 1963, S. 429 ff.
107. Kupperman, H. S. and Lefkovich, S. C.: Progesterone in problems of sterility. *Fert. Steril.* 8, 1957, S. 131 ff.
108. Fuchs, F. and Stakemann, G.: Treatment of threatened premature labor with large doses of progesterone. *Am. J. Obstet. Gynec.* 79, 1960, S. 172 ff.
109. Jones, H. W. and Wilkins, L.: The genital anomaly associated with prenatal exposure to progestagens. *Fert. Steril.* 11, 1960, S. 148 ff.
110. Dorigo, L.: Considerazioni sul destino metabolico del progesterone placentare nella gestosica. *Monitore ostet. - ginec.* 31, 1960, S. 592 ff. in: *Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* 75, 1961, S. 90
111. Kankaanrinta, T. and Forssell, O.: Some aspects of the urinary of pregnanediol in late pregnancy toxemia. *Annls. Chir. Gynaec. Fenn.* 50, 1961, S. 434 ff. in: *Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* 82, 1963, S. 277
112. Furuholm, M.: The excretion of oestriol and pregnanediol in toxemia of pregnancy and in postmaturity. *Acta obstet. gynec. scand.* 41, 1962, S. 370 ff.
113. Maeyama, M., Ueda, H., Negoro, T., Nakano, Y. and Kariya, I.: The progesterone metabolism in toxemia and hydatidiform mole. *Wakayama med. Rep.* 5, 1960, S. 93 ff. in: *Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* 73, 1961, S. 310
114. Simmer, H. und Simmer, L.: Progesteron im peripheren Venenblut von Schwangeren mit Spätgestose. *Klin. Wschr.* 37, 1959, S. 971 ff.
115. Borsø, A.: Eclampsia e progesterone. *Quad. Clin. ostet. ginec.* 16, 1961, S. 379 ff. in: *Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* 77, 1962, S. 294
116. Panella, I.: Azione del progesterone sul ricambio glucidico delle donne in menopausa. *Annali Ostet. Ginec.* 82, 1960, S. 695 ff. in: *Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* 73, 1961, S. 31

117. Pece, G.: La pregnandioluria in relazione alla escrezione urinaria di aldosterone nella gravida diabetica.
Monitore ostet. - ginec. 33, 1962, S. 399 ff.
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 81, 1963, S. 141
118. Bergstrand, C. G. and Gemzell, C. A.: Pregnanediol excretion in normal children and in children with various endocrine disorders, including congenital adrenal hyperplasia.
J. clin. Endocr. Metab. 17, 1957, S. 870-877
119. Twombly, G. H.: Luteomas of the ovary.
Am. J. Obstet. Gynec. 51, 1946, S. 832 ff.
120. Ojima, N.: The therapeutic use of pregnanediol.
Trans. 1. Asia Oceania reg. Congr. Endocr. 1959, I, S. 2
in: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 72, 1960, S. 266

Herrn Professor Dr. Stark danke ich für die Überlassung des Themas und für die ständige hilfsbereite Unterstützung bei der Arbeit.

Herrn Dr. Waldi (E. Merck A.G. Darmstadt) bin ich für die Einführung in die Methodik zu Dank verpflichtet.

und Herrn Dr. Horbach (Institut für Statistik und Dokumentation, Univ. Mainz) für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

LEBENS LAUF

Am 25.4.1939 wurde ich, Silke Ricarda Biebl, als Tochter des Arztes Professor Dr. Maximilian Biebl und seiner Ehefrau Käthe, geborene Klauß in Magdeburg geboren. Mein Vater besaß einen vollen Lehrauftrag für Chirurgie an der Medizinischen Akademie Magdeburg und war bis 1962 Direktor der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Altstadt in Magdeburg und ist jetzt emeritiert. Mein 3 Jahre älterer Bruder ist wissenschaftlicher Assistent der Physik an der Akademie in Berlin-Ost.

Nach einer vierjährigen Volksschulzeit, die ich bei Verwandten in Warberg/Kreis Helmstedt verbrachte, besuchte ich von 1950 bis 1953 die Rosa Luxemburg-Schule und die Leibnitzschule in Magdeburg. 1953 kam ich dann auf die Humboldt-Oberschule in Magdeburg und bestand dort 1957 die Reifeprüfung.

Da mein Gesuch auf Zulassung zum Studium der Medizin an der Humboldt-Universität Berlin aus sozialen und politischen Gründen abgelehnt wurde, entschloß ich mich im Herbst desselben Jahres, über West-Berlin in die Bundesrepublik zu übersiedeln, um dort mein Studium aufnehmen zu können. In Koblenz legte ich im Okt. 1957 die Ergänzungsprüfung zur Reifeprüfung der SBZ ab, so daß ich zu Anfang des Wintersemesters 1957/58 in Mainz das Medizinstudium beginnen konnte. Im Okt. 1958 absolvierte ich hier das Vorphysikum und im Aug. 1960 das Physikum. Eine geplante Studienzeit in Innsbruck oder Wien mußte unterbleiben, da mir das vom Ausgleichsamt gezahlte Stipendium nur in Deutschland zuerkannt wurde. So verbrachte ich auch die klinischen Semester in Mainz. Nach 7 klinischen Semestern beendete ich meine medizinischen Studien. Im August 1965 meldete ich mich dann in Mainz zur Ablegung der Ärztlichen Prüfung, die ich im Januar 1966 mit der Gesamtnote 'gut' abgeschlossen habe.

Bei Herrn Professor Dr. Stark, Universitäts-Frauenklinik Mainz, bemühte ich mich um die Überlassung eines Themas für eine Dissertationsarbeit. Diese habe ich nun fertiggestellt und bitte um Annahme der Arbeit durch die Fakultät.

